

Université de Sherbrooke

**Étude du profil d'expression des cytochromes P450 dans le carcinome
hépatocellulaire : à la recherche de nouveaux biomarqueurs**

Par
Camille Martenon Brodeur
Programme de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences (M. Sc.)
en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mars, 2019

Membres du jury d'évaluation
Pr. Martin Bisaillon, département de biochimie
Pre. Michelle Scott, département de biochimie
Pr. François Boudreau, département d'anatomie et biologie cellulaire

© Camille Martenon Brodeur, 2019

RÉSUMÉ

Étude du profil d'expression des cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire : à la recherche de nouveaux biomarqueurs

Par
Camille Martenon Brodeur
Programme de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le carcinome hépatocellulaire est la deuxième cause de décès par cancer au monde. L'une des raisons est le diagnostic tardif des patients à un stade où seulement l'ablation de la tumeur n'est plus un traitement efficace.

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour améliorer le dépistage précoce de l'hépatocarcinome, les données de séquençage de l'ARN de tissus d'hépatocarcinomes, générées par *The Cancer Genome Atlas*, ont été comparées à celles de tissus de foie sains. Il a ainsi été possible d'identifier plus de 4000 gènes dont l'expression est significativement dérégulée dans les tissus tumoraux, dont plusieurs appartiennent à la famille des cytochromes P450 (CYP450). L'analyse des niveaux d'expression des gènes de chacun des patients a permis d'identifier 8 CYP450 candidats. Le changement d'expression de 6 d'entre eux a été validé par qPCR sur des échantillons d'ADN complémentaire de tissus sains et cancéreux.

Du côté des caractéristiques diagnostiques de ces CYP450, la répression de CYP1A2, CYP2B6 ou CYP2C19, au niveau de l'ARNm, sous leur seuil respectif, permet l'identification des tissus cancéreux avec une sensibilité et une spécificité de 90% à 100%. Une répression de leur niveau d'expression en protéine est également observable dans les tissus cancéreux par immunohistochimie. Finalement, ce changement d'expression est identifiable peu importe la présence ou non d'une infection aux virus de l'hépatite B et/ou C chez les patients et dès le stade 1 des tumeurs.

En conclusion, il semblerait que les cytochromes P450, particulièrement CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19, soient des biomarqueurs potentiels pour le carcinome hépatocellulaire permettant un diagnostic plus précoce et l'amélioration du traitement des patients.

Mots clés : cancer, carcinome hépatocellulaire, biomarqueur, séquençage d'ARN, expression de gènes, cytochromes P450

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abbréviations.....	vii
Introduction.....	1
1. Le carcinome hépatocellulaire	1
1.1. Le développement du cancer	1
1.2. La carcinogenèse de l'hépatocarcinome	3
1.3. Les traitements.....	5
1.4. La surveillance du carcinome hépatocellulaire	6
1.4.1. L'ultrasonographie.....	6
1.4.2. L'alpha-fœtoprotéine.....	6
1.5. Les nouveaux biomarqueurs pour l'hépatocarcinome	8
1.5.1. Définition.....	8
1.5.2. L'alpha-fœtoprotéine-L3.....	9
1.5.3. La des-γ-carboxyprothrombine.....	10
1.5.4. Les microARN	10
2. Les cytochromes P450	12
2.1. Les caractéristiques générales des cytochromes P450	12
2.2. La régulation de la transcription des cytochromes P450	13
2.3. Les fonctions exogènes des cytochromes P450	14
2.4. Les fonctions endogènes des cytochromes P450	15
2.4.1. Les éicosanoïdes	15
2.4.2. Le cholestérol et les acides biliaires.....	15
2.4.3. Les hormones stéroïdiennes.....	16
2.4.4. La vitamine D et l'acide rétinoïque.....	17
2.5. Les cytochromes P450 dans le cancer	19
3. Le séquençage d'ARN.....	20
3.1. Le séquençage d'ARN dans l'hépatocarcinome	21
3.2. The Cancer Genome Atlas	22

Hypothèse et objectif de recherche.....	23
Hypothèse.....	23
Objectif	23
Sous-objectif 1	23
Sous-objectif 2	23
Article	24
Avant-propos	24
Résumé	25
Abstract.....	26
Background.....	27
Results	29
Discussion.....	38
Conclusion	39
Materials and methods	40
Declarations.....	43
Additional file	44
References	49
Résultats	53
Investigation des cytochromes P450 dans les tumeurs hépatiques	53
Évaluation du rôle des cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire via des modèles de lignées cellulaires	57
Discussion	62
Analyse transcriptomique du carcinome hépatocellulaire	62
Rôles des cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire	64
Conclusion.....	69
Liste des références.....	70
Annexes.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses	2
Figure 2. Nomenclature des cytochromes P450	12
Figure 3. Réaction générale catalysée par les cytochromes P450	13
Figure 4. Voies de synthèse des hormones stéroïdiennes	17
Figure 5. Immunohistochimie de CYP19A1, CYP17A1, CYP7A1 et CYP26A1 sur des tissus d'hépatocarcinomes et des tissus normaux adjacents	54
Figure 6. Courbes ROC des cytochromes P450 significativement dérégulés dans le carcinome hépatocellulaire	55
Figure 7. Classification des échantillons de la cohorte test selon leur niveau d'expression adéquat des 3 biomarqueurs potentiels	56
Figure 8. Mesure de l'expression des cytochromes P450 candidats dans les lignées cellulaires modèles	57
Figure 9. Validation de la répression des cytochromes P450 7A1, 17A1 et 19A1 dans les HepG2	58
Figure 10. Validation de la surexpression des cytochromes P450 7A1, 17A1 et 19A1 dans les THLE-2	59
Figure 11. Essai de prolifération cellulaire des THLE-2 surexprimant les cytochromes P450 7A1, 17A1 ou 19A1	60
Figure 12. Évaluation du niveau d'expression protéique des cytochromes P450 dans les lignées cellulaires HepG2 et THLE-2	60
Figure 13. Évaluation au niveau protéique de la surexpression des cytochromes P450 7A1, 17A1 ou 19A1 dans les cellules THLE-2	61

ARTICLE

Figure 1. Transcriptomic study of hepatocellular carcinoma.....	30
Figure 2. Global profiling of the cytochromes P450 expression landscape in hepatocellular carcinoma	32
Figure 3. Specific gene expression analysis of the eight cytochromes P450 between hepatocarcinoma and normal tissues.....	33
Figure 4. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of candidates cytochromes P450 for HCC identification	35
Figure 5. Investigation of potential biomarkers at protein levels in HCC and expression fold change across cancers	37
Figure S1. Gene ontology and protein-protein interaction analysis of repressed genes in HCC.....	45
Figure S2. Expression variation profile of cytochromes P450 in HCC	46
Figure S3. Validation of cytochromes P450 expression variation in HCC	47
Figure S4. Investigation of cytochromes P450 characteristics across HCC stage or cancers	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des fonctions des cytochromes P450	18
---	----

ARTICLE

Table S1. CYP450 expression in non-infected, HBV, HCV or HBCV infected HCC compared to normal non-infected tissues	44
---	----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A.U.	<i>Arbitrary units</i> ; Unités arbitraires
ADNc	ADN complémentaire
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AFP-L3	<i>Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein</i> ; La fraction de l'AFP réactive à l'agglutinine de <i>lens culinaris</i>
AUC	<i>Area under the curve</i> ; Aire sous la courbe
CTNNB1	Bêta-caténine
CYP450	Cytochrome P450
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DCP	des-gamma-carboxyprothrombine
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
FPKM-UQ	<i>Upper quartile fragments per kilobase of transcript per million</i> ; Quartile supérieur du nombre de fragments par kilo paires de bases par millions de lectures
FMN	Flavine mononucléotide
FMNH ₂	Flavine mononucléotide réduite
H ₂ O	Monoxyde de dihydrogène; eau
HBCV	<i>Hepatitis B and C viruses</i> ; Virus de l'hépatite B et C
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> ; Virus de l'hépatite B
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> ; Carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> ; Virus de l'hépatite C
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Peroxydase de raifort
LCA	<i>Lens culinaris agglutinin</i> ; Agglutinine de la <i>Lens culinaris</i>
miARN	<i>microARN</i>
mL	Millilitre
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH+H ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NAT	<i>Normal adjacent tissue</i> ; Tissu normal adjacent
ng	Nanogramme
NoHV	<i>No hepatitis virus</i> ; pas de virus de l'hépatite
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Réaction en chaîne par polymérase
qPCR	PCR quantitatif
PTGIS	<i>Prostaglandin I2 Synthase</i> ; Prostaglandine I2 synthase
qRT-PCR	<i>Reverse transcription qPCR</i> ; Transcription inverse suivi d'un qPCR

RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> ; Séquençage de l'ARN
ROC curve	<i>Receiver operating characteristics curve</i> ; Courbe de la fonction d'efficacité du récepteur
shARN	<i>Short hairpin RNA</i> ; Petit ARN en épingle à cheveux
siARN	<i>Small interfering RNA</i> ; Petit ARN interférent
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i> ; Transcriptase inverse de la télomérase
TPM	<i>Transcripts per million</i> ; Nombre de transcrits par millions
WB	<i>Western Blot</i> ; Immunobuvardage de type Western

INTRODUCTION

1. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (ou hépatocarcinome, HCC), qui représente près de 90% des cancers du foie, est le 4e cancer avec le plus haut taux de mortalité à travers le monde (Ferlay et al., 2015; WHO, 2018). Ce cancer est associé à plusieurs facteurs de risque, notamment la cirrhose du foie, l'infection chronique par les virus de l'hépatite B et/ou C (HBV et HCV), la consommation excessive d'alcool ou encore l'ingestion de l'aflatoxine B1 (American Cancer Society, 2016). Le développement du vaccin contre le virus de l'hépatite B a permis de réduire les cancers du foie qui en résultaient. Cependant, le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter d'année en année, notamment à cause de l'augmentation de la prévalence du diabète, de l'obésité, des infections par le virus de l'hépatite C, de la stéatose hépatique non alcoolique et de la stéato-hépatite non alcoolique (Han, 2012). Ceci en fait le sixième cancer le plus répandu actuellement, avec une incidence 3 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Torre et al., 2015).

1.1. Le développement du cancer

La conversion d'une cellule saine en cellule cancéreuse comporte l'acquisition de 10 principales caractéristiques qui lui procurent la capacité de former une tumeur puis des métastases. Ces cellules ont donc une prolifération soutenue et indépendante des signaux d'arrêt, sont résistantes à la mort cellulaire et à la destruction par les cellules immunitaires, réactivent la télomérase et deviennent donc immortelles, ont un métabolisme énergétique altéré, induisent l'angiogenèse et acquièrent des propriétés invasives et métastatiques. Le micro-environnement inflammatoire de la cellule contribue également à lui fournir des signaux de prolifération (figure 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

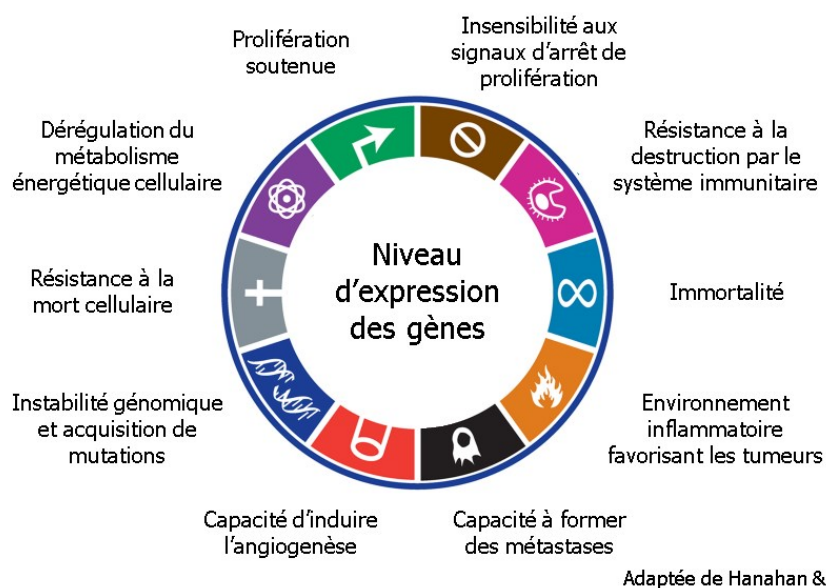


Figure 1. Caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses. Des variations dans le niveau d'expression de gènes peuvent mener à l'acquisition des 10 caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses.

La progression tumorale se fait graduellement à cause d'une instabilité génomique et de l'acquisition de mutations et de modifications dans le patron épigénétique qui activent ou inhibent l'expression de gènes impliqués dans chacune des caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses. En effet, ceci peut résulter à la perte d'expression ou à la surexpression d'une protéine ou à l'expression d'une protéine mutée entraînant un gain ou une perte de fonction. Le récepteur au facteur de croissance épithélial (*EGFR*) est un gène dont l'amplification a été répertoriée dans de nombreux cancers, comme celui de l'ovaire, de la vessie ou du cerveau (Libermann et al., 1984). L'augmentation de l'expression de ce récepteur mène à une plus forte activation des voies de signalisation auxquelles il participe et peut ainsi induire la transformation des cellules (Di Fiore et al., 1987; Normanno et al., 2006). Le niveau d'expression des gènes est donc un processus influencé par une multitude de facteurs, comme des réarrangements chromosomiques, des modifications épigénétiques, la dérégulation de facteurs de transcription ou des voies de signalisation qui les activent, et joue un rôle clé dans le développement de tumeurs.

1.2. La carcinogenèse de l'hépatocarcinome

Comme mentionné précédemment, certaines conditions générant de l'inflammation ou de la nécrose entraînent l'apparition de fibrose hépatique et la prolifération des hépatocytes. Lors du processus de régénération du foie, via la division cellulaire accrue des hépatocytes dans un environnement pathologique, plusieurs modifications génétiques surviennent et peuvent promouvoir le développement du carcinome hépatocellulaire (Han, 2012).

Le processus exact de l'hépatocarcinogenèse comporte de nombreuses étapes très hétérogènes d'une tumeur à l'autre et demeure relativement méconnu (Han, 2012). Cependant, grâce aux nouvelles technologies d'analyse à haut débit, un grand nombre de mutations somatiques, de réarrangements chromosomiques, de variations épigénétiques et de variations d'expression de gènes ont été répertoriées dans les cellules cancéreuses. Les altérations génétiques les plus fréquentes dans le carcinome hépatocellulaire sont des mutations activatrices dans le promoteur du gène *TERT*, codant pour la sous-unité de la télomérase, et dans la séquence codante de la β -caténine (*CTNNB1*).

La mutation survenant de manière précoce dans la carcinogenèse du cancer du foie est celle du promoteur du gène *TERT* dans 44% à 59% des tumeurs (Nault et al., 2013). Une augmentation de l'activité de la télomérase est observée dans près de 90% des cancers, ce qui contribue à l'immortalisation des cellules via l'élongation constante des télomères (Kim et al., 1994). Dans les tissus d'hépatocarcinomes, il y a une surexpression de l'ARN de *TERT*, cependant, elle ne corrèle pas toujours avec la présence d'une mutation dans le promoteur (Nault et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

En ce qui concerne la β -caténine, une mutation dans son gène est identifiée dans 20% à 40% des HCC (Coste et al., 1998; H. Huang et al., 1999). Les mutations sont principalement retrouvées au site de phosphorylation de la β -caténine, ce qui empêche sa dégradation et lui permet d'agir comme facteur de transcription dans la voie de signalisation de WNT (Barth, Näthke, & Nelson, 1997; Coste et al., 1998; Polakis, 1999). Étant donné que des mutations de *CTNNB1* ne sont pas présentes dans les précurseurs de lésions ni dans la totalité des tumeurs, il semblerait qu'il s'agisse d'une altération survenant plus tardivement dans l'hépatocarcinogenèse (Park et al., 2005).

Le gène suppresseur de tumeur *TP53*, le plus fréquemment altéré dans les cancers, est réprimé ou possède une mutation qui entraîne une perte de fonction dans environ 30% des hépatocarcinomes (Kandoth et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017). Étant donné le rôle central de *TP53* dans l'apoptose, la sénescence et la différenciation des cellules, ces processus se retrouvent inhibés dans les cellules atteintes (Fridman & Lowe, 2003).

Des modifications épigénétiques ont également été répertoriées dans le HCC, notamment une hyperméthylation du promoteur du gène *CDKN2A*, un joueur important dans la régulation du cycle cellulaire, qui est alors inactivé dans 53% des tumeurs (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

Outre ces altérations retrouvées de manière plus fréquente dans les hépatocarcinomes, plusieurs voies de signalisation clés pour la régulation de l'expression des gènes ou la progression du cycle cellulaire impliquent des gènes altérés dans plusieurs tumeurs comme celle des RTK/RAS/PI3K (*VEGFA*, *PTEN*, *KRAS*, *AKT1/2*), WNT (*AXIN1*, *MYC*), le cycle cellulaire (*MDM4*, *CCND1*, *RB1*), des modificateurs de la chromatine (*ARID1A/B*, *CREBBP*, *IDH1/2*, *ARID2*) et de nombreux autres (Han, 2012; Schulze et al., 2015; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

Ces caractéristiques retrouvées chez les cellules cancéreuses représentent des cibles thérapeutiques intéressantes. Il est évalué qu'environ 28% des patients atteints d'hépatocarcinome possèdent au moins une altération ciblée par une drogue actuellement approuvée par la *Food and Drug Administration*. Parmi les cibles de ces drogues, on retrouve l'amplification ou la mutation de *FLT* (chez 6% des patients), *FGF3/4/19* (4%), *PDGFR* (3%), *VEGFA* (1%) et *BRAF* (<1%) (Schulze et al., 2015). Cependant, la proportion de patients éligibles est faible étant donné la grande hétérogénéité des carcinomes hépatocellulaires, chaque patient ayant une signature génétique et moléculaire particulière. Des traitements personnalisés seraient préférables et possiblement envisageables d'ici quelques années, considérant que 86% des patients arborent une mutation ciblée par des drogues actuellement en essais cliniques (phase I à III) (Schulze et al., 2015).

D'ici le développement de ces traitements, les options thérapeutiques actuelles sont plus générales et systémiques.

1.3. Les traitements

Parmi les traitements actuellement disponibles pour l'hépatocarcinome, seulement quelques-uns sont potentiellement curatifs, soit la résection de la tumeur, l'ablation locale par radiothérapie ou la greffe d'organe. Ces traitements permettent d'augmenter le taux de survie jusqu'à 70% après 5 ans (Llovet, Fuster, & Bruix, 1999). Cependant, cette espérance de vie, pour les patients subissant une résection de la tumeur, est exacte seulement pour ceux ayant une bonne santé globale du foie au moment de la chirurgie. Dans la majorité des cas, le taux de survie sera inférieur et le taux de récurrence peut atteindre jusqu'à 50% après 3 ans (Llovet et al., 1999).

Considérant les critères stricts d'admissibilité à ces traitements curatifs, moins de 30% des patients sont diagnostiqués à un stade suffisamment précoce et ont conservé des fonctions hépatiques suffisamment saines pour être éligibles (Bruix & Llovet, 2002). Pour ces tumeurs de stade intermédiaire, la chimio-embolisation est le traitement privilégié. Il s'agit d'un traitement combinant un agent chimiothérapeutique et le blocage de la circulation sanguine vers la tumeur et permet d'augmenter l'espérance de vie à 26 mois (Llovet & Bruix, 2003). En ce qui concerne les patients atteints d'une tumeur de stade avancé, les traitements systémiques avec des inhibiteurs de kinases peuvent permettre de prolonger la survie d'environ 3 mois. C'est le cas notamment du *sorafenib*, un inhibiteur de tyrosines kinases de *VEGFR*, *PDGFR* et *RAF*, résultant à une diminution du cycle cellulaire et de l'angiogenèse via plusieurs voies de signalisation (Llovet et al., 2008). Finalement, les patients atteints d'hépatocarcinome d'un stade très avancé ont une espérance de vie médiane de 3 mois et ne recevront que des soins palliatifs.

Considérant la faible efficacité des traitements systémiques pour le carcinome hépatocellulaire et que le développement de traitements personnalisés pour chaque patient selon les caractéristiques de leur tumeur est un processus à long terme, le diagnostic précoce du HCC demeure pertinent pour améliorer le pronostic des patients.

1.4. La surveillance du carcinome hépatocellulaire

La majorité des carcinomes hépatocellulaires se développent chez les patients identifiés comme étant à risque, principalement à cause de la présence d'une cirrhose, d'antigènes contre la protéine X du virus de l'hépatite B, de diabète, etc. Les symptômes sont habituellement une douleur abdominale, une perte de poids et d'appétit, une jaunisse et de la fièvre, mais ils n'apparaissent généralement qu'à un stade avancé du cancer (American Cancer Society, 2016). Un suivi tous les 6 mois est donc effectué avec ces patients pour permettre la surveillance active de l'apparition d'une tumeur. Cette fréquence de suivi des patients à risque a été fixée afin de détecter les tumeurs à un stade précoce, considérant que le temps nécessaire à une lésion pour atteindre une taille détectable d'environ 2 cm est de 4 à 12 mois (Yoshino, 1983).

1.4.1. L'ultrasonographie

La méthode actuellement privilégiée pour la détection de lésions au foie est l'imagerie par ultrasons, ou ultrasonographie, un test qui présente une sensibilité et une spécificité de 70% et 93%, respectivement (Bruix et al., 2001; Zhang & Yang, 1999). Cependant, l'analyse est très subjective et les lésions de petites tailles sont difficilement détectables par cette technique d'imagerie. L'examen doit donc être réalisé par un professionnel ayant un haut niveau d'expertise, ce qui limite la disponibilité de ce type de test dans les centres de santé en communauté.

1.4.2. L'alpha-fœtoprotéine

La mesure du niveau d'expression d'un biomarqueur permet de détecter plus facilement, par une prise de sang, de manière plus objective et possiblement avec une meilleure sensibilité la présence d'une tumeur.

Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, le marqueur tumoral est l'alpha-fœtoprotéine (*AFP*), une protéine exprimée dans le foie en développement des fœtus. Contrairement aux autres membres de la famille des albumines, l'AFP subit une perte d'expression presque

totale, jusqu'à un niveau non-détectable, dans le sérum seulement quelques semaines après la naissance (Abelev et al., 1963; Sauzay et al., 2016). Cependant, la production de l'AFP est réactivée dans les cellules d'hépatocarcinome, par un mécanisme encore mal caractérisé (Abelev, 1971). Le dosage du niveau d'AFP dans le plasma permet donc le dépistage d'un carcinome hépatocellulaire.

L'utilisation de l'alpha-fœtoprotéine comme biomarqueur pour ce cancer comporte cependant plusieurs limitations. Tout d'abord, la concentration d'AFP mesurée dans le plasma des patients est très variable, allant de 0 ng/mL à plus de 100 000 ng/mL (Bialecki & Di Bisceglie, 2005). Elle est positivement corrélée avec la taille de la tumeur, la présence d'une infection au virus de l'hépatite B, le niveau de dédifférenciation des cellules, la présence d'invasion vasculaire et la progression tumorale (Liu et al., 2013; Ohba et al., 2012). Les patients atteints de tumeurs métastatiques ont donc le niveau d'AFP le plus élevé. Ces corrélations peuvent être utiles pour caractériser la tumeur, mais limitent énormément la capacité de détecter les petites lésions. Il a également été répertorié que près de 30% des carcinomes hépatocellulaires ne sécrètent pas d'AFP et ces patients sont donc des faux-négatifs suite au dosage de ce marqueur (Bialecki & Di Bisceglie, 2005).

Finalement, plusieurs autres conditions sont associées avec une augmentation de l'AFP, notamment certaines tumeurs comme celles de l'estomac ou du testicule (Kohn, 1978; McIntire et al., 1975), une insuffisance hépatique aigue (Schjødt et al., 2006), l'hépatite chronique (Hu et al., 2004), certaines maladies neurodégénératives (Waldman & McIntire, 1972) et la grossesse (Mizejewski, 2003).

Tous ces facteurs font en sorte qu'il est difficile d'établir un seuil d'expression pouvant distinguer les patients sains de ceux atteints de carcinome hépatocellulaire. Généralement, un seuil de 20 ng/mL est utilisé pour le dépistage, alors qu'une concentration au-delà de 400 ng/mL permet de diagnostiquer le cancer chez les patients. Cependant, la sensibilité de ce test de dépistage, soit la proportion d'échantillons cancéreux adéquatement identifiés, n'est que d'environ 60%, alors que la spécificité, soit la proportion d'échantillons sains adéquatement identifiés, varie de 78 à 91% selon les études (Gambarin-Gelwan et al., 2000; Ishii et al., 2000; Kondo, Kimura, & Shimosegawa, 2015; Trevisani et al., 2001).

La possibilité de combiner l'utilisation de l'alpha-fœtoprotéine comme marqueur à l'ultrasonographie pour la surveillance de l'hépatocarcinome a été envisagée, mais ne permet pas une meilleure identification des patients atteints. En effet, cela permet une

augmentation de 6% à 8% du taux de détection des HCC, mais le taux de faux-positifs augmente considérablement et le ratio coûts-bénéfices est faible (Kondo et al., 2015).

Considérant les faibles performances de l'AFP comme biomarqueur, l'*American Association for the Study of Liver Diseases* et l'*European Association for the Study of the Liver* ont retiré le dosage de l'AFP sanguin des critères recommandés pour le diagnostic du HCC (Bruix & Sherman, 2011; European Association for the Study of the Liver & European Organisation for Research and Treatment of Cancer, 2012).

1.5. Les nouveaux biomarqueurs pour l'hépatocarcinome

Dans l'objectif d'améliorer le dépistage des tumeurs du foie à un stade précoce, de nombreux efforts portent à identifier de nouveaux biomarqueurs.

Un très grand nombre de gènes ou de microARN ayant une expression différentielle ont été identifiés, dont les principaux sont l'alpha-fœtoprotéine-L3 (*Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein) et la des-γ-carboxyprothrombine (*DCP*).

1.5.1. Définition

Un biomarqueur, dans le contexte d'une pathologie comme le cancer, est défini comme une caractéristique qui reflète un processus biologique normal, un processus pathogénique ou une réponse thérapeutique et qui est mesuré de manière objective (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Il peut s'agir d'une protéine, d'un ARN ou de toute autre molécule biologique ou caractéristique génétique qui peut être détecté dans la circulation sanguine, les sécrétions corporelles ou un tissu. La présence d'une altération au niveau de ce marqueur, comme une modification de son niveau d'expression ou une mutation, permet de différencier un échantillon sain d'un échantillon pathologique ou encore, peut permettre de déterminer un pronostic ou la réponse à un traitement (Henry & Hayes, 2012). L'un des exemples les plus connus de biomarqueur pour le dépistage d'un cancer est l'antigène prostatique spécifique (PSA), où sa surexpression chez les hommes indique la présence d'un cancer de la prostate (Ercole et al., 1987; Wang et al., 1979). D'un autre côté, l'amplification

du récepteur Her2 dans le cancer du sein est un indicateur du pronostic et permet de prédire une réponse favorable aux traitements anti-Her2 (Hudziak et al., 1989; Slamon et al., 1987).

Un bon biomarqueur est spécifique à une condition pathologique, donc non retrouvé en conditions normales, et il est suffisamment sensible pour détecter l'ensemble des échantillons pathologiques. Ces deux critères se quantifient en tant que spécificité, soit la probabilité que le biomarqueur soit négatif dans les échantillons normaux, et sensibilité, c'est-à-dire la probabilité que le test soit positif pour les échantillons pathologiques (Simon, 2015).

1.5.2. L'alpha-fœtoprotéine-L3

L'alpha-fœtoprotéine existe sous différentes formes qui se distinguent par leurs groupements glycosylés et qui sont classifiées et isolées selon leur affinité pour les protéines lectines (Kerckaert, Bayard, & Biserte, 1979).

Les patients atteints d'hépatite chronique ou de cirrhose expriment majoritairement la forme AFP-L1, la forme non réactive à l'agglutinine de la *Lens culinaris* (LCA). La forme AFP-L2, ayant une affinité intermédiaire pour la LCA, est retrouvée dans le liquide amniotique, donc chez les femmes enceintes et chez les patients atteints de tumeurs dérivées du sac vitellin. Finalement, la présence d'un carcinome hépatocellulaire est associée à un niveau plus élevé d'AFP-L3, qui possède la plus grande affinité pour la LCA, dans le sérum des patients (Brebrowicz, Mackiewicz, & Brebrowicz, 1981; Taketa, 1990; Taketa et al., 1990). Considérant sa surexpression seulement en condition d'hépatocarcinome, l'alpha-fœtoprotéine-L3 a rapidement été considérée comme un biomarqueur potentiel (Sato et al., 1993).

La quantification de la proportion d'AFP-L3 par rapport à la quantité totale d'AFP permet la distinction entre la présence d'un l'hépatocarcinome et une autre condition pathologique qui engendre une augmentation d'AFP. Ceci permet d'avoir une spécificité de 92% avec un ratio seuil de 10%, mais la sensibilité n'est que de 37% (Sterling et al., 2009). Cependant, une nouvelle technique d'analyse plus sensible permet d'augmenter la sensibilité à 57% avec une spécificité de 63%. De plus, l'AFP-L3 performe relativement bien pour la détection de tumeurs de moins de 20 mm de diamètre avec une concentration d'AFP inférieure à 20

ng/mL, avec une sensibilité et une spécificité de 44,6% et 71,2%, respectivement (Oda et al., 2011).

1.5.3. La des-γ-carboxyprothrombine

La des-gamma-carboxyprothrombine (DCP) est une forme de la thrombine anormalement gamma-carboxylée produite par le foie en conditions pathologiques, comme la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (Blanchard et al. , 1981; Corrigan, Jeter, & Earnest, 1982). La DCP permettrait une meilleure distinction entre la présence d'un carcinome hépatocellulaire d'une cirrhose hépatique non-maligne avec une sensibilité et une spécificité de 92% et 93%, respectivement. Dans une étude, la DCP a permis de détecter 15 des 17 HCC de stade précoce ayant un niveau d'AFP sous le seuil de 20 ng/mL. Il a donc été établi qu'un seuil de 150 mAU/mL de DCP serait un bon critère pour le dépistage du HCC avec 86% et 93% de sensibilité et de spécificité, respectivement (Volk et al., 2007). Cependant, dans plusieurs autres études, les performances de la DCP comme biomarqueur sont plus modestes, avec une sensibilité variant entre 48% et 62%, mais une spécificité de 81% à 98% (Grizzi et al., 2007; Marrero et al., 2003). La DCP semble donc adéquate pour la détection des tumeurs à un stade précoce en condition cirrhotique, mais démontre de moins bonnes performances pour des cohortes plus variées de carcinomes hépatocellulaires.

Une récente étude a évalué les performances de la combinaison de ces trois marqueurs, soit l'AFP, l'AFP-L3 et la DCP, mais il semblerait que l'AFP seule demeure le biomarqueur avec le plus de potentiel pour l'identification des HCC, avec une légère amélioration lorsqu'elle est combinée à la DCP (Park et al., 2017).

1.5.4. Les microARN

Les microARN sont de petites séquences d'ARN non-codant d'environ 22 nucléotides qui participent à la régulation post-transcriptionnelle des gènes en se liant sur leur séquence complémentaire au niveau des ARN messagers cibles, menant généralement à leur dégradation (Guo et al., 2010; Zamore et al., 2000). Plus récemment, il a également été démontré que certains microARN peuvent activer la transcription de gènes cibles,

permettant ainsi d'activer ou d'inhiber des processus comme le cycle cellulaire (Vasudevan, Tong, & Steitz, 2007). Il a été observé que le niveau d'expression des microARN est dérégulé en conditions pathologiques, comme le cancer, et qu'ils peuvent donc avoir un rôle dans la carcinogenèse (Calin et al., 2002). Il est maintenant bien établi que l'expression des microARN est dérégulée dans pratiquement tous les cancers (Lu et al., 2005) et que, grâce à leur grande stabilité, ils peuvent être quantifiés dans le sérum et être utilisés comme biomarqueurs (Calin et al., 2005; Chen et al., 2008; Hunter et al., 2008).

Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, une première étude a démontré la présence dans le sérum des patients de miR-21, miR122 et miR-223, des microARN dérégulés dans le HCC. La quantification de chacun d'entre eux permet de distinguer la présence d'un HCC des contrôles sains avec une sensibilité de 84%, 70% et 80%, respectivement, et une spécificité de 73%, 69% et 76%. Cependant, ces microARN sont également surexprimés en condition d'hépatite chronique, ce qui diminue l'efficacité de ces marqueurs à identifier la présence d'un HCC dans ce contexte (Xu et al., 2011). En effet, une autre étude a déterminé que miR-21 permet de distinguer les HCC des contrôles sains avec une sensibilité et une spécificité de 87% et 96% respectivement, mais ces caractéristiques diminuent à 61% et 86% lorsque le HCC doit être distingué d'une hépatite chronique. Cependant, une combinaison de l'expression de miR-21 et de l'AFP permet d'atteindre une sensibilité de 93% et une spécificité de 94% pour la distinction des HCC des contrôles sains et, dans le cas de la distinction du HCC d'une hépatite chronique, ces performances atteignent environ 80% chacune (Tomimaru et al., 2012).

Plusieurs autres biomarqueurs potentiels ont été identifiés pour le carcinome hépatocellulaire, comme la glypicane-3 (*GPC3*) (Hippo et al., 2004; Sung et al., 2003; Tangkijvanich et al., 2010), la protéine du Golgi 73 (*GP73*) (Marrero et al., 2005) ou miR-16 (Qu et al., 2011). Certains donnent des informations intéressantes sur la tumeur, comme l'expression de la cytokératine 19 (*CK19*) qui corrèle avec le pronostic des patients (Kim et al., 2011).

Cependant, dans tous ces cas, les capacités du biomarqueur à identifier la présence d'un carcinome hépatocellulaire sont bonnes, mais pas excellentes. Il est par contre possible d'observer que certains marqueurs performant très bien pour certains individus, mais moins bien pour d'autres, ce qui peut s'expliquer par la grande variabilité génotypique des

hépatocarcinomes répertoriés. Il est donc de plus en plus établi qu'une combinaison de plusieurs marqueurs est essentielle pour détecter un maximum de HCC, peu importe le contexte comme la présence d'une cirrhose, d'une infection par les virus HBV ou HCV, mais aussi de manière spécifique, puisque plusieurs biomarqueurs sont dérégulés dans diverses pathologies.

2. Les cytochromes P450

2.1. Les caractéristiques générales des cytochromes P450

Par définition, les cytochromes P450 (CYP450) sont des hémoprotéines qui peuvent lier un monoxyde de carbone lorsqu'elles sont sous forme réduite, ce qui génère un pic d'absorption à 450 nm (Nebert & Russell, 2002).

Les cytochromes P450 sont retrouvés chez pratiquement tous les organismes, des procaryotes aux humains (Nebert et al., 1987; Nebert, Wikvall, & Miller, 2013). Ils sont classifiés, selon leur séquence d'acides aminés, en famille, s'ils ont plus de 40% d'identité, puis en sous-famille, s'ils ont plus de 55% d'identité (figure 2) (Nelson et al., 1996).

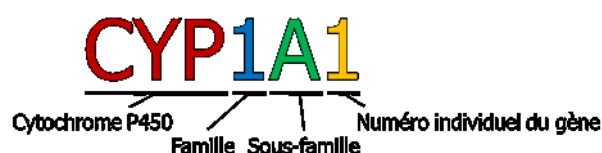
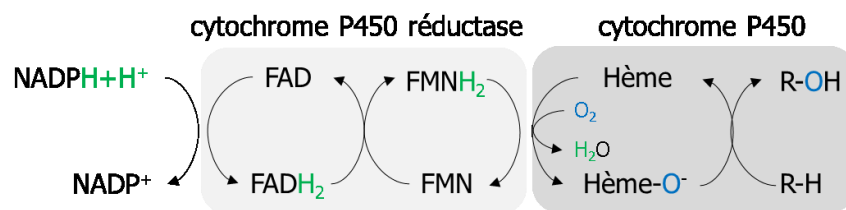


Figure 2. Nomenclature des cytochromes P450. Les cytochromes P450 sont classés en familles identifiées par un chiffre arabe (plus de 40% d'identité), puis en sous-familles identifiées par une lettre (plus de 55% d'identité). Chacun des gènes est ensuite numéroté, généralement selon l'ordre de leur découverte. Malgré que tous les CYP450 sont nommés de cette manière, certains ont également un nom spécifique relié à leurs fonctions, comme CYP8A1 qui est également nommé PTGIS (*Prostaglandin I2 Synthase*) à cause de son rôle dans la synthèse de la prostaglandine I2 (Yates et al., 2017).

Chez l'humain, il existe 57 cytochromes P450 (Danielson, 2002) localisés dans le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries des cellules et catalysent principalement des réactions monooxygénases d'une grande variabilité de substrats (figure 3) (Nebert et al., 2013).



Adaptée de <http://watcut.uwaterloo.ca>

Figure 3. Réaction générale catalysée par les cytochromes P450. Le substrat, représenté ici par le groupement R, est monooxygéné par un cytochrome P450. Pour se faire, une cytochrome P450 réductase transfère deux électrons du NADPH, H⁺, via deux flavines (FAD et FMN), au groupement hème du cytochrome P450. Ces atomes d'hydrogènes lient ensuite un atome d'oxygène, pour former de l'eau, alors que le deuxième oxygène est alors hautement réactif et réalise une attaque sur le substrat où il restera lié (Munro, Girvan, & Mclean, 2007).

Le foie est l'organe qui contient la plus grande concentration de CYP450, mais on en retrouve également dans les intestins, le placenta, le cerveau, la peau, les reins, et d'autres organes (Nishimura et al., 2003). Ils sont autant impliqués dans la détoxification des xénobiotiques que dans la synthèse et le métabolisme de molécules endogènes (tableau 1). Certains des CYP450 sont exprimés de manière constitutive par les cellules, alors que pour d'autres, leur expression est inducible par la présence du substrat, ce qui contribue notamment aux interactions entre deux drogues qui seraient métabolisées ou activées par le même CYP450 (Huttunen et al., 2008). L'activité enzymatique de certains CYP450 est grandement affectée par des polymorphismes et ils sont donc étudiés pour évaluer, chez chaque individu, le métabolisme de drogues thérapeutiques ou la susceptibilité à l'activation de pro-carcinogènes (Nebert, McKinnon, & Puga, 1996).

2.2. La régulation de la transcription des cytochromes P450

La régulation de l'expression des cytochromes P450 est un processus complexe, principalement parce qu'une multitude de ligands peuvent se lier à plusieurs récepteurs et que plusieurs voies de signalisation intracellulaires peuvent éventuellement activer ou inhiber la transcription des CYP450.

Le récepteur aryl hydrocarboné (*AhR*) est le principal récepteur cytoplasmique qui, une fois lié par son ligand comme les dérivés d'acide arachidonique ou les hydrocarbures

aromatiques polycycliques, transloque au noyau où il se lie aux translocateurs nucléaires d'Ahr (*ARN7*). Finalement, ce complexe interagit avec des régions d'ADN précises, soit les éléments de réponse aux xénobiotiques (*XRE*), retrouvées dans les séquences de certains cytochromes P450 pour activer leur transcription (Czekaj & Skowronek, 2012; Honkakoski & Negishi, 2000).

De nombreux récepteurs nucléaires, comme le récepteur constitutif des androstanes (*CAR*), le récepteur X de prégnane (*PXR*), le récepteur à la vitamine D (*VDR*), le récepteur des acides biliaires (*BAR*), le récepteur des oxystérols (*LXR*), les récepteurs des oestrogènes (*ER*) et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (*PPAR*), agissent également comme facteurs de transcription une fois liés à leurs ligands puis transloqués au noyau où ils dimérisent avec le récepteur X des rétinoïdes (*RXR*) (Xu, Li, & Kong, 2005). Chacun de ces complexes a une affinité spécifique pour différentes séquences d'ADN, comme le site de liaison des récepteurs nucléaires 1 (*NR1*) ou le module activateur de réponse aux xénobiotiques (*XREM*), pour induire la transcription de gènes spécifiques.

L'hormone de croissance (*GH*) joue également un grand rôle dans l'activation de nombreuses voies de signalisation et peut induire ou inhiber certains facteurs de transcription des CYP450, dont *Bcl6*, *Myc* et *Egr1* (Wauthier & Waxman, 2008).

STAT5b est un régulateur clé de l'expression des CYP450 dans le foie via l'hormone de croissance et sa coopération avec les facteurs nucléaires des hépatocytes (*HNFs*) (S. Park, Wiwi, & Waxman, 2006).

Finalement, de nombreuses voies de signalisation intracellulaires peuvent induire l'expression de cytochromes P450, dont celles du facteur nucléaire kappa B (*NF- κ B*), des protéines kinases (*MAPK*) et de la bêta-caténine, en plus des récepteurs aux glucocorticoïdes et des facteurs de transcription *Nrf2* et *C/EBP* (Braeuning, 2009; Dvorak & Pavlek, 2010; Murray, Cui, & Zhou, 2010; Yokota et al., 2011; Zordoky & El-kadi, 2009).

2.3. Les fonctions exogènes des cytochromes P450

Le foie est reconnu pour sa fonction de dégradation des composés exogènes. Le métabolisme des xénobiotiques comporte 2 principales étapes qui visent généralement à rendre la molécule plus polaire pour favoriser son excrétion via le sang ou l'urine. Lors de la phase I, une oxydation ou une réduction du substrat sera réalisée par des CYP450,

généralement des familles 1 à 4, ou, dans certains cas, une hydrolyse sera catalysée par des estérases ou des amidases (tableau 1) (Nebert & Dalton, 2006; William, 1971).

Par exemple, CYP2A6 (cytochrome P450 famille 2, sous-famille A, polypeptide 6) est impliqué dans le métabolisme de nombreuses drogues thérapeutiques et de toxines comme la nicotine et CYP2D6 est responsable du métabolisme d'environ 20% des drogues prescrites (Nakajima et al., 1996; Nebert, Wikvall, & Miller, 2013).

Cependant, dans certains cas, l'oxydation d'un composé peut mener à son activation. Cette caractéristique est utilisée pour la conception de pro-drogues comme le cyclophosphamide, mais en contrepartie, cela peut également mener à l'activation de pro-carcinogènes (Clarke & Waxman, 1989). C'est le cas notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques, présents dans le tabac, qui sont métabolisés par CYP1A1 (Shimada & Fujii-Kuriyama, 2004).

2.4. Les fonctions endogènes des cytochromes P450

2.4.1. Les éicosanoïdes

Plusieurs CYP450 des familles 1 à 4 participent à la transformation de plus d'une centaine d'éicosanoïdes, issus de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone comme l'acide arachidonique (Makita, Falck, & Capdevila, 1996). Il y aura alors formation de leucotriènes, de prostaglandines et de thromboxanes qui sont impliqués, entre autres, dans l'induction de la prolifération cellulaire, l'inflammation, la vasoconstriction et l'adhésion cellule-cellule (Kroetz & Zeldin, 2002).

De leur côté, CYP5A1 et CYP8A1 jouent un rôle dans la coagulation sanguine, étant respectivement impliqués dans l'aggrégation et la désaggrégation des plaquettes (Haurands & Ullrich, 1985; Heckers & Ullrich, 1989).

2.4.2. Le cholestérol et les acides biliaires

Le cholestérol fait partie de la composition des membranes cellulaires et est le précurseur pour la synthèse de nombreux composés comme les acides biliaires, les oxystérols et les hormones stéroïdiennes. Les acides biliaires agissent comme détergents pour l'absorption

intestinale de lipides et de vitamines lipophiles, mais participent également à l'activation de voies de signalisation impliquant l'homéostasie des lipides et le métabolisme de drogue (Chiang, 2009). De leur côté, les oxystérols sont des transporteurs du cholestérol et des régulateurs de son homéostasie Nebert et al., 2013).

Plusieurs réactions de synthèse de ces composés sont réalisées par des cytochromes P450, notamment la dernière étape de la biosynthèse du cholestérol à partir d'acétate par le CYP51A1 (Lepesheva & Waterman, 2007). Sa conversion en oxystérols ou en acides biliaires implique CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP27A1, CYP3A4, CYP46A1 et CYP39A1 (Nebert et al., 2013). D'ailleurs, la réaction catalysée par CYP7A1, une enzyme spécifique au foie, dans la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est la première de ce processus et l'étape limitante (Bloch, Berg, & Rittenberg, 1943).

2.4.3. Les hormones stéroïdiennes

Plusieurs CYP450 participent à la synthèse d'hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol (figure 4). Cette catégorie de stéroïdes comporte les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les androgènes, les œstrogènes et les progestogènes, chacun ayant des rôles importants pour l'organisme, comme le métabolisme du glucose, la régulation de la pression sanguine, l'homéostasie de l'eau et du sel, ainsi que le développement et le maintien des caractéristiques sexuelles (Miller & Auchus, 2011).

CYP11A1 catalyse la conversion du cholestérol en pregnénolone, l'étape limitante de cette chaîne de réactions (Stone & Hechter, 1955). CYP17A1 réalise ensuite son hydroxylation, puis pour la voie de synthèse des hormones sexuelles, il y aura également un clivage pour générer les précurseurs à 19 carbones. CYP21A2, CYP11B1 et CYP11B2 sont ensuite responsables de la synthèse des corticoïdes, alors que CYP19A1 catalyse l'aromatisation des androgènes en œstrogènes (Miller, 1988).

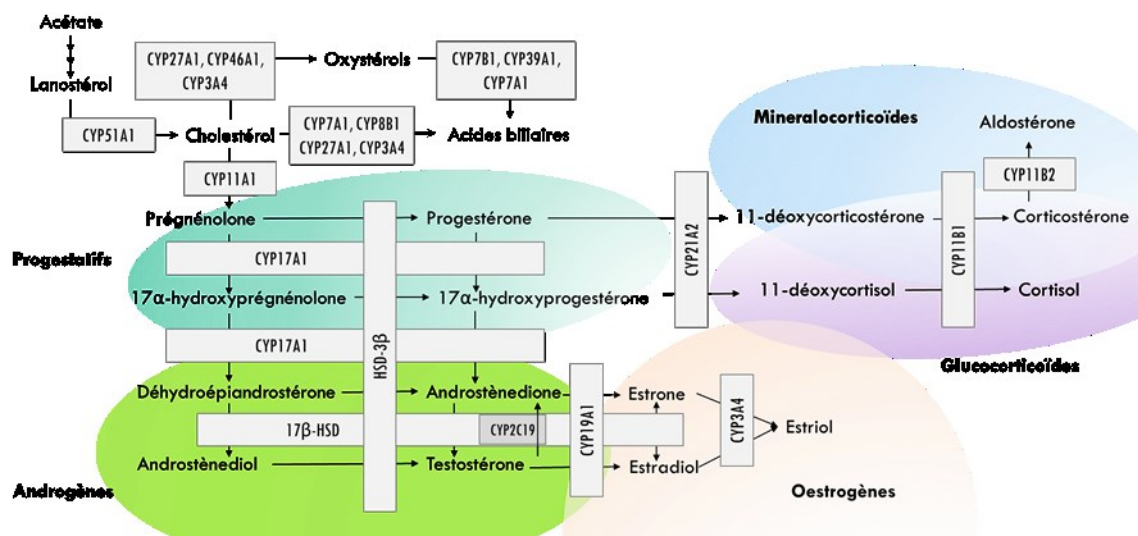


Figure 4. Voies de synthèse des hormones stéroïdiennes. Schéma des réactions catalysées par les cytochromes P450 dans la biosynthèse des corticostéroïdes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) et des hormones sexuelles (progestatifs, androgènes et oestrogènes).

2.4.4. La vitamine D et l'acide rétinolique

Les cytochromes P450 sont également impliqués dans de nombreux autres processus, comme l'activation de la vitamine D, essentielle pour le métabolisme du calcium, par CYP27B1 ou son inactivation par CYP2R1 et CYP27A1 via des réactions d'hydroxylation (Cheng et al., 2003; Takeyama et al., 1997).

L'acide rétinolique, de son côté, est un morphogène essentiel pour la formation des organes et l'établissement des axes lors du développement, en plus de participer à la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Sa synthèse à partir du rétinol implique, entre autres, CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6, alors que sa dégradation est exécutée par les 3 cytochromes P450 de la famille 26, soit CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1 (Thatcher & Isoherranen, 2009; Tomita et al., 1996).

Cependant, étant donné la complexité des réactions catalysées par les cytochromes P450 et de leurs substrats, en plus de la grande similarité entre les CYP450, certains sont encore orphelins. En effet, aucune fonction spécifique n'est associée à CYP2A7, CYP4A22 et CYP20A1, notamment (tableau 1) (Guengerich & Cheng, 2011).

Considérant le rôle central des cytochromes P450 dans la dégradation de xénobiotiques ainsi que dans la biosynthèse et le métabolisme de composés endogènes impliqués dans divers processus cellulaires importants, il est incontestable qu'ils sont essentiels pour le déroulement normal des processus cellulaires et pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme. D'ailleurs, des mutations ou la perte d'expression de nombreux CYP450 ont été répertoriées pour avoir un effet critique pour l'organisme, comme c'est le cas notamment pour l'absence de CYP51A1 fonctionnel qui cause une létalité embryonnaire (Keber et al., 2011).

Tableau 1. Résumé des fonctions des cytochromes P450.

Famille	Gènes	Fonctions
1	CYP1A1 CYP1B1 CYP1A2	Métabolisme d'écosanoides et de xénobiotiques
2	CYP2A6 CYP2C8 CYP2E1 CYP2A7 CYP2C9 CYP2F1 CYP2A13 CYP2C18 CYP2J2 CYP2C19 CYP2R1 CYP2S1 CYP2B6 CYP2D6 CYP2U1 CYP2W1	Métabolisme de nombreuses drogues, d'écosanoides et de xénobiotiques
3	CYP3A4 CYP3A5 CYP3A7 CYP3A43	Métabolisme de nombreuses drogues, d'écosanoides et de xénobiotiques
4	CYP4A11 CYP4F2 CYP4V2 CYP4A22 CYP4F3 CYP4X1 CYP4F8 CYP4Z1 CYP4B1 CYP4F11 CYP4F12 CYP4F22	Métabolisme de quelques drogues, d'écosanoides et de xénobiotiques. (CYP4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1: Fonctions inconnues)
5	CYP5A1	Aggrégation plaquettaire
7	CYP7A1 CYP7B1	Synthèse des acides biliaires
8	CYP8A1 CYP8B1	Métabolisme des écosanoides et désagrégation plaquettaire
11	CYP11A1 CYP11B1 CYP11B2	Métabolisme du cholestérol et synthèse des corticostéroïdes
17	CYP17A1	Synthèse des hormones sexuelles
19	CYP19A1	Synthèse des oestrogènes
20	CYP20A1	Fonction inconnue
21	CYP21A2	Synthèse des corticostéroïdes
24	CYP24A1	Dégradation de la vitamine D ₃
26	CYP26A1 CYP26B1 CYP26C1	Inactivation de l'acide rétinolique
27	CYP27A1 CYP27B1 CYP27C1	Synthèse des acides biliaires, activation de la vitamine D ₃ (CYP27C1: Fonction inconnue)
39	CYP39A1	Synthèse des acides biliaires
46	CYP46A1	Dégradation du cholestérol dans le cerveau
51	CYP51A1	Synthèse du cholestérol

2.5. Les cytochromes P450 dans le cancer

Les cytochromes P450 sont susceptibles de jouer un rôle important dans le développement de tumeurs puisqu'ils peuvent dégrader ou activer des carcinogènes (Brodie, Gillette, & La Du, 1958; Guengerich, 1986). De plus, ils peuvent influencer la réponse aux traitements en métabolisant de manière plus ou moins efficace les molécules thérapeutiques ou encore activer des pro-drogues (Chang et al., 1993).

De nombreuses thérapies se basent sur une caractéristique spécifique aux cellules cancéreuses, comme la chimiothérapie qui, en inhibant la mitose, affecte les cellules qui se divisent rapidement, comme les cellules cancéreuses. CYP1B1 est l'une des cibles d'intérêt pour le traitement de cancers, notamment via l'utilisation de lymphocytes T ciblant les cellules exprimant CYP1B1, étant donné sa surexpression dans la majorité des tumeurs (Gribben et al., 2005; Murray et al., 1997). Certaines études ont également investigué le rôle potentiel de ce CYP450 dans la tumorigenèse. Il semble donc que la surexpression de CYP1B1 participe à l'augmentation de la prolifération cellulaire, à la progression du cycle cellulaire, à la résistance à l'apoptose, à la migration et à l'invasion des cellules tumorales dans le cancer de la prostate, de l'endomètre, du cou et de la tête et bien d'autres (Chang et al., 2017; Saini et al., 2009; Shatalova et al., 2011).

D'autres thérapies anti-cancéreuses visent plutôt à priver la tumeur d'éléments essentiels à sa croissance, comme c'est le cas pour les tumeurs hormono-dépendantes qui seront traitées par des anti-oestrogènes, par exemple. L'absence d'oestrogènes dans son environnement empêche l'activation des récepteurs aux oestrogènes (*ER*) et la cascade de signalisation menant à une croissance cellulaire accrue (Del Re, Michelucci, Simi, et al., 2012).

En effet, pour les cancers du sein qui nécessitent une quantité élevée d'oestrogènes pour leur croissance, un inhibiteur de CYP19A1, une enzyme participant à la synthèse d'oestrogènes, peut être utilisé comme traitement (Beatson, 1896; Lonning, 2004). Le même principe est utilisé pour le cancer de la prostate où un taux élevé de testostérone active des voies de signalisation via le récepteur aux androgènes et promeut ainsi la progression tumorale (Brinkmann, 2011; Huggins & Hodges, 1941). L'acétate d'abiratone est l'un des inhibiteurs de CYP17A1, une enzyme impliquée dans la synthèse des androgènes, qui est

utilisé pour les cancers de la prostate résistants à la castration (Rowlands et al., 1995; Ryan et al., 2010).

D'autres cytochromes P450 ont été identifiés pour avoir un rôle dans le cancer, principalement via les fonctions de leurs substrats. C'est le cas notamment de CYP26A1, qui métabolise l'acide rétinoïque, et qui a été identifié comme étant surexprimé dans le cancer du côlon et du sein. Dans ces tissus, il y a donc une diminution de la quantité d'acide rétinoïque sous forme active, ce qui suggère qu'une déficience en vitamine A promeut la carcinogenèse, notamment via la résistance à l'apoptose (Brown et al., 2014; Osanai & Petkovich, 2005; Osanai, Sawada, & Lee, 2010).

Le profil des éicosanoïdes a été trouvé comme étant dérégulé dans divers cancers et de plus en plus d'évidences indiquent qu'ils peuvent avoir un rôle dans la carcinogenèse (Wang & Dubois, 2010). Par exemple, les membres des sous-familles CYP4A et CYP4F, produisant l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE), sont surexprimés dans plusieurs tissus cancéreux et sont associés avec l'induction de la tumorigenèse (Falck, Belosludtsev, & Falck, 1995; Varilly & Chandler, 2012).

CYP2J2, un autre CYP450 impliqué dans la conversion de l'acide arachidonique, est également surexprimé dans plusieurs carcinomes et sa surexpression dans des lignées cellulaires accélère leur prolifération et induit une résistance à l'apoptose induite par le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Jiang et al., 2005).

Dans le contexte du carcinome hépatocellulaire, les cytochromes P450 ont davantage été étudiés selon leurs polymorphismes et leurs effets sur le métabolisme des drogues (Preissner et al., 2013). De plus, une étude a démontré que les individus ayant un phénotype de fort métaboliseur selon les polymorphismes de CYP2D6 avaient un risque 6 fois plus élevé de développer un HCC, alors que ceux avec un polymorphisme de faible métaboliseur ont un risque diminué de 90% (Agúndez et al., 1995; Silvestri et al., 2003).

3. Le séquençage d'ARN

L'arrivée de technologies à haut débit permet une analyse globale de l'état des cellules. Le séquençage des ARN messagers (RNA-seq) permet l'identification de tous les transcrits présents dans un type cellulaire à un moment donné (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).

Pour ce faire, les molécules d'ARNm sont isolées via leur queue poly(A), fractionnées, rétro-transcrites en ADN complémentaire et séquencées. Chaque lecture est ensuite alignée au transcriptome de référence afin d'identifier à quel gène elle appartient (Kukurba & Montgomery, 2015). Il est également possible de quantifier le niveau d'expression d'un ARNm via le nombre de lectures alignées sur sa séquence de référence. L'expression peut être exprimée en nombre de transcrits par millions de paires de bases du transcrit (TPM) ou en nombre de fragments par kilo paires de bases par millions de lectures (FPKM), ce qui permet de normaliser le nombre de lectures alignées par la longueur du gène et le nombre de lectures totales alignées sur les gènes codants (NCI, 2018). En comparant le niveau d'expression d'un gène donné dans 2 situations, il est possible de quantifier son changement d'expression (ou *fold change*). Ainsi, il est possible, dans le cas présent, d'identifier les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains du foie.

3.1. Le séquençage d'ARN dans l'hépatocarcinome

Quelques analyses de l'hépatocarcinome par micropuce à ADN ou par séquençage d'ARN à haut débit ont été réalisées par des groupes de recherche afin de mieux caractériser ce cancer (Huang et al., 2011; Jia et al., 2007; Yang et al., 2017; Zhou et al., 2018). Dans tous les cas, quelques centaines de gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés dans les cellules cancéreuses. Ces gènes sont principalement associés au cycle cellulaire, au métabolisme et aux processus immunitaires (Huang et al., 2011; Zhou et al., 2018). Cela a donc permis d'établir la possibilité d'étudier les changements d'expression des gènes dans le carcinome hépatocellulaire afin d'utiliser ces variations pour dépister le cancer du foie ou encore pour développer des drogues ciblant ces gènes.

Dans certaines études, des protéines d'intérêts ont été caractérisées plus en profondeur et c'est ainsi que MELK, GPC3, MDK, SERPINI1 et BIRC5 ont démontré un potentiel à être des biomarqueurs (Jia et al., 2007; Yang et al., 2017; Zhou et al., 2018). Dans d'autres cas, le niveau d'expression d'un gène permettrait la caractérisation de la tumeur, comme c'est le cas pour SREPINA11 qui est un indicateur du stade de la tumeur alors que BIRC5 et CCNE1 permettent de prédire le pronostic (Yang et al., 2017; Zhou et al., 2018).

Il est cependant important de mentionner que plusieurs études ont été réalisées sur un nombre restreint d'échantillons, sur des tissus cancéreux non appariés à un tissu normal adjacent, sans validation dans une autre cohorte d'échantillons ou encore sans caractérisation approfondie des gènes différentiellement exprimés (Zhou et al., 2018). De plus, l'avancement constant des technologies permet le séquençage d'ARN exprimés à un plus faible niveau et une meilleure quantification. Il est donc toujours pertinent d'étudier le transcriptome du carcinome hépatocellulaire pour avoir une meilleure compréhension des processus pathogéniques et d'identifier et caractériser de nouveaux biomarqueurs pour ce cancer.

3.2. The Cancer Genome Atlas

Les analyses à grande échelle pour la comparaison de tissus sains et cancéreux nécessitent une cohorte d'échantillons suffisamment grande et des ressources pour la prise en charge de ces données. *The Cancer Genome Atlas* a donc été créé par *the National Cancer Institute* et *the National Human Genome Research Institute* dans l'objectif de bâtir un répertoire publiquement accessible de données génomiques de tissus sains et tumoraux de divers cancers. Ainsi, le séquençage de l'ADN, le profil du nombre de copies d'ADN, l'identification des polymorphismes, le séquençage de l'ARN et des microARN, le profil de méthylation de l'ADN et le profil d'expression des protéines ont été réalisés sur des biopsies de plus de 11 000 patients atteints de 33 types de cancers (Tomczak, Czerwińska, & Wiznerowicz, 2015). En ce qui concerne le carcinome hépatocellulaire, 371 échantillons de tissus cancéreux et 50 échantillons de tissus normaux issus de la marge saine ont été récoltés et analysés par séquençage de l'ARN.

Toutes ces données permettent maintenant à de nombreux groupes de recherche d'investiguer les éléments clés de la carcinogenèse, les caractéristiques associées à des sous-groupes de tumeurs et la comparaison de différents types de cancers dans l'objectif d'éventuellement améliorer la prise en charge et le traitement des patients.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE RECHERCHE

Hypothèse

La faible espérance de vie des patients atteints de carcinome hépatocellulaire est en partie due au diagnostic tardif, ce qui limite l'efficacité des traitements. Un biomarqueur plus sensible et plus spécifique pour le HCC est donc nécessaire pour l'amélioration du suivi des patients à risque. Les cellules cancéreuses ont de grandes variations dans l'expression de leurs gènes, ce qui leur procure des caractéristiques particulières. Ces gènes pourraient donc être facilement quantifiables pour détecter la présence d'un HCC, soit au niveau de l'ARNm ou des protéines dans un échantillon de tissus ou encore dans le sang des patients via les cellules cancéreuses circulantes ou les vésicules extracellulaires sécrétées par les tumeurs .

Objectif

Identifier un ou plusieurs gènes dont l'expression est significativement modifiée dans les cellules de carcinome hépatocellulaire et étudier leur potentiel à être un biomarqueur pour le dépistage de ce cancer.

Sous-objectif 1

À partir des données de séquençage d'ARN de tissus hépatiques sains et de tissus d'hépatocarcinomes générées par *The Cancer Genome Atlas*, identifier les gènes dont l'expression est significativement dérégulée.

Sélectionner des gènes candidats, appartenant à une famille de gènes enrichie parmi les gènes dérégulés, dont le niveau d'expression est significativement différent dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains.

Valider ces changements d'expression par qPCR dans une cohorte indépendante d'échantillons.

Déterminer la capacité de ces gènes à discriminer un échantillon d'hépatocarcinome d'un échantillon de foie sain et évaluer la possibilité qu'ils soient de bons biomarqueurs pour le carcinome hépatocellulaire.

Sous-objectif 2

Investiguer les conséquences biologiques du changement d'expression de ces gènes dans des lignées cellulaires modèles.

ARTICLE

Dissecting the expression landscape of cytochromes P450 in hepatocellular carcinoma: towards novel molecular biomarkers

Camille Martenon Brodeur¹, Philippe Thibault², Mathieu Durand², Jean-Pierre Perreault¹ and Martin Bisaillon¹

¹ Département de biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Laboratoire de Génomique Fonctionnelle, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Article soumis à BMC Medical Genomics (2018)

Avant-propos

Ma contribution à cet article est d'environ 90%. J'ai participé au design expérimental avec les professeurs Martin Bisaillon et Jean-Pierre Perreault. L'acquisition des données de séquençage d'ARN, publiées par *The Cancer Genome Atlas*, a été réalisée par Philippe Thibault. J'ai réalisé les analyses d'expression différentielle des gènes. Les qPCR sur les échantillons d'ADN complémentaire ont été effectués par Mathieu Durand. J'ai fait la rédaction du manuscrit, assistée par Pr. Martin Bisaillon et Pr. Jean-Pierre Perreault.

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est la deuxième cause de décès reliée au cancer au monde. Le faible taux de survie des patients est en partie attribuable à l'absence de biomarqueur efficace qui mène à un diagnostic tardif et des traitements limités. Dans l'optique de découvrir de nouveaux biomarqueurs pour le HCC, les données de séquençage d'ARN de tissus de foie sains et cancéreux, publiées par *The Cancer Genome Atlas*, ont été analysées. Suite à des filtres statistiques stringents, plus de 4 000 gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés dans les tissus cancéreux, avec un enrichissement des gènes de la famille des cytochromes P450 (CYP450). Le niveau d'expression de 8 CYP450 candidats a été validé par qPCR dans des échantillons d'ADN complémentaire de tissus de patients. Finalement, la répression de CYP1A2, CYP2B6 ou CYP2C19, sous leur seuil d'expression préalablement déterminé, permet l'identification des tissus cancéreux avec une sensibilité et une spécificité d'au moins 90%. Ces 3 cytochromes P450 sont donc de nouveaux biomarqueurs prometteurs pour la détection de l'hépatocarcinome.

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer-related death around the world. The poor survival rates can be attributable to the absence of efficient biomarkers that leads to a tardive diagnosis of HCC. With the aim of discovering new biomarkers for HCC, RNA-Seq data of tumor and normal liver tissues, generated by The Cancer Genome Atlas, were analyzed.

Results: Following stringent statistical filters, more than 4,000 genes were identified as significantly dysregulated in HCC, with an enrichment in cytochromes P450 (CYP450) family genes. The expression level of eight specific CYP450 was validated by qPCR on cDNA samples, and expression thresholds were established to discriminate HCC from normal tissues. The repression of CYP1A2, CYP2B6, or CYP2C19 above their respective threshold results in sensitivity and specificity above 90% for confident identification of HCC tissues.

Conclusions: CYP1A2, CYP2B6, or CYP2C19 expression levels show promising outcomes for HCC tissues identification.

Key Words

Hepatocellular carcinoma, Gene expression, Biomarker, Cytochrome P450

Background

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the cancer with the second highest mortality rate worldwide[1]. It is associated with risk factors such as hepatitis B and C virus (HBV and HCV) infection, alcohol consumption, or aflatoxin B1 exposition[2]. HCC occurrence is still rising even in developed countries where it is associated with obesity, diabetes, and HCV infection[3]. The poor survival rate of HCC patients (1 and 5-year survival rate of 44% and 17%, respectively[4]) is partly due to limited treatment options and their unsatisfactory efficacy. Liver transplantation or surgical resection of the tumor are the only curative treatments[5]. However, since HCC diagnosis is generally late, more than 80% of patients are not eligible, and chemoembolization or drugs have to be used but, at an advanced tumor stage, these treatments have limited efficacy[6]. Early diagnosis of patients for hepatocellular carcinoma is then crucial for the outcome.

HCC screening is generally made by imagery techniques, such as ultrasound or computed tomography (only for tumor of 1 cm or more) or by assessing the alpha-fetoprotein (AFP) serum level[7, 8]. AFP is a glycoprotein produced by fetal yolk sac and liver, and its concentration decreases rapidly after birth. Some conditions, like pregnancy or cancer, can generate high AFP level in serum[9]. AFP level can give information about liver tumor since it is positively correlated with HBV infection, tumor size, low cellular differentiation, and reaches the highest level in the case of metastatic tumor[10–12]. However, its low expression in early stage cancers makes it a poor biomarker for large-scale HCC screening, especially since 30% of patients with HCC continuously have normal AFP level[13]. Other pathologies such as cirrhosis and stomach cancer also have elevated AFP and made this marker relatively non-specific to HCC[14]. This contributes to a sensitivity that vary from 55% to 61%, and specificity of 78% to 91% when a 20 ng/mL level cut-off is used for HCC screening[15].

The low sensitivity and high false-positive rate of AFP as marker therefore justify the identification of better biomarkers for HCC screening. The development of new technologies, notably in genomics, allows characterization of molecular events involved in carcinogenesis, including mRNA expression level and their measurement in tissue samples. The Cancer Genome Atlas (TCGA) research network recently overviewed HCC and normal liver tissue data obtained from multiple genomic platforms. They identified important characteristics of HCC such as significantly mutated genes (e.g. CTNNB1A, TP53, TERT promoter), different

promoter methylation profiles (hypermethylation of CDKN2A that cause silencing of this gene), key pathways affected in HCC (WNT, SHH, RTK/KRAS, chromatin remodeling and metabolic programming) and much more[3]. In the current study, RNA sequencing data from the TCGA of HCC and normal liver tissue were used to identify differentially expressed genes and find potential biomarkers for HCC.

Results

Modification of the gene expression landscape in hepatocellular carcinoma

During carcinogenesis, cancer cells acquire multiple types of alterations, such as mutations, that modify the transcription of target genes. The resulting gene expression differences can then be used to discriminate between normal and cancer cells. In this study, the gene expression profile of hepatocellular carcinoma (HCC) tissues was compared to the transcriptome of normal liver tissues based on RNA sequencing data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) in order to identify new potential biomarkers. The overview of the steps used towards the identification of such differences in gene expression of HCC tissues is presented in Fig 1A. To focus on transcriptomic changes resulting from carcinogenesis and not from viral infection, analyses were made on non-infected tissues (no hepatitis virus; NoHV), tumor tissues (T), and normal (N) tissues (Fig. S2A). Gene average expression, in transcript-per-millions (TPM), of 220 TNoHV was then compared to average expression in 38 NNoHV tissues to establish a fold change (presented in base 2 logarithm). The distribution of gene expression fold-change (Fig. 1B) revealed that the majority of genes have similar expression level in both conditions, although some have a variation of expression that reaches over 3,000-fold in tumors. The gene list, containing 23,393 genes detected either in HCC or normal tissues, was then filtered to select differentially expressed genes. Genes detected in at least two samples in both conditions were kept and, to correct for multiple statistical hypothesis testing, q-value were calculated, and values inferior to 0.05 were considered significant. Finally, a fold-change of at least four was chosen as a cut-off to be suitable to distinguish HCC from normal tissues. This allowed the identification of 4,130 overexpressed and 75 repressed genes in HCC (Fig. 1C). Gene ontology analysis of the overexpressed genes, using DAVID, indicates enrichment in biological processes generally associated with carcinogenesis such as cell-cell signaling, cell adhesion, cell proliferation and cell cycle processes. Among repressed genes, gene ontology analysis showed immune and defense response, notably in complement cascade, as the most enriched biological processes. Down-regulation of some immune response genes was also mentioned in a previous study[16]. In the case of repressed genes, a protein-protein interaction network between them was generated using the STRING database. For the overexpressed genes, only the gene ontology analysis was considered since the online version of the database is limited to networks of 2,000 proteins, and that a network of 4,130

proteins would be highly complex. However, for the 75 repressed genes, this analysis revealed the presence of a network of 6 proteins encompassing 4 cytochromes P450 (CYP450) (Fig.1D). Interestingly, vitamin A, diterpenoid, and retinoid metabolic processes, which are all associated with CYP450 (Fig S1A), were also observed in the gene ontology analysis previously performed on repressed genes. This suggests that cytochrome P450 family is enriched among dysregulated genes in hepatocellular carcinoma.

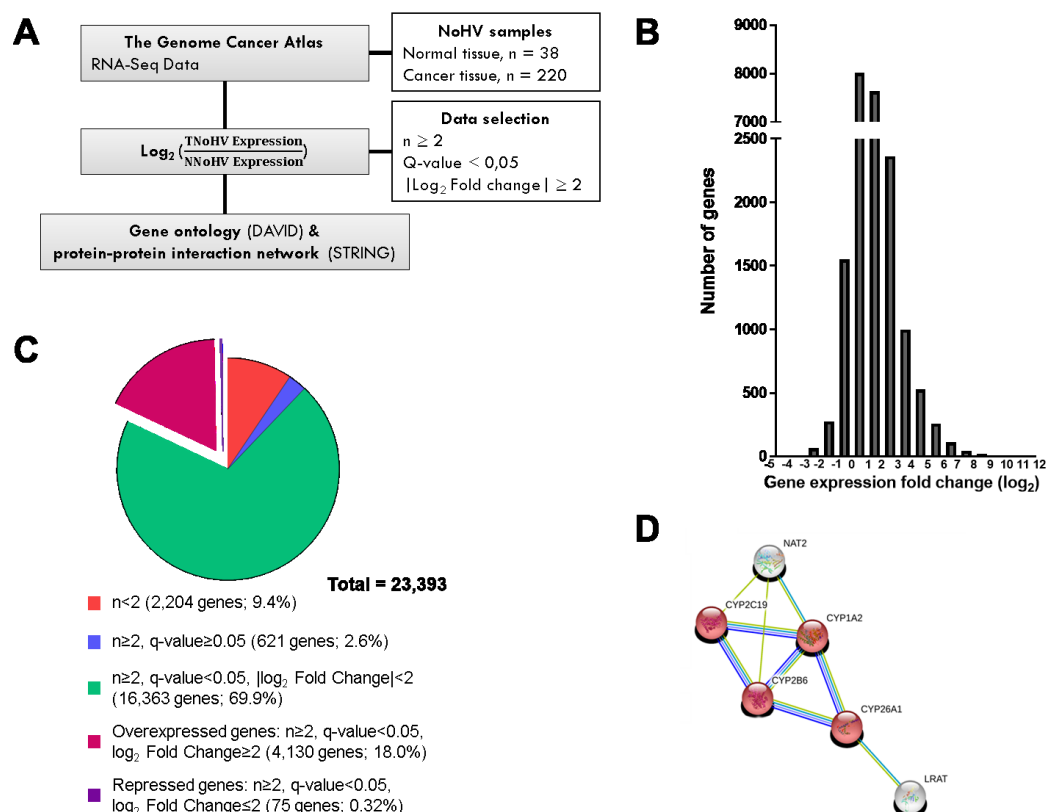


Figure 1. Transcriptomic study of hepatocellular carcinoma. (A) Overview of the strategy used to identify the changes in cellular transcriptome of hepatocellular carcinoma (HCC) tumors and the potential biomarkers genes, based on the RNA-Seq data of 220 HCC and 38 normal liver tissues, both without viral infection, from The Cancer Genome Atlas (TCGA). N: Normal, T: Tumor, NoHV: no hepatitis virus infection, HBV: hepatitis B virus infected tissue, HCV: hepatitis C virus infected tissue, HBCV: hepatitis B and C virus infected tissue. (B) Distribution of hepatocellular carcinoma gene expression levels as compared to healthy liver cells. The variations in gene expression are presented in a logarithmic scale (\log_2). (C) Statistical analysis of gene expression fold change to identified significantly dysregulated genes in HCC. 4,130 overexpressed (magenta) and 75 repressed (purple) genes were selected for further analysis. (D) Gene node with monooxygenase activity (protein-protein interaction enrichment p-value: $1.93e-14$; false discovery rate: 0.0254) found in the protein-protein interaction network of 75 genes for which the expression was

repressed in hepatocellular carcinoma. Complete network is available in figure S1B. The network was determined by uploading the gene list into STRING.

Cytochromes P450 expression profile in hepatocellular carcinoma

Considering CYP450 family enrichment among dysregulated genes in HCC, their global profiling was investigated. In humans, 57 CYP450 genes are expressed in multiple tissues such as liver, placenta, brain, kidney and intestines where they catalyze monooxygenase activity on specific substrates[17, 18]. Some CYP450 participate in the metabolism of xenobiotics in the liver such as environmental chemicals or therapeutic drugs. Other CYP450s have a role in the biotransformation of endogenous compounds like cholesterol, steroid hormones, bile acids or eicosanoids[17, 19]. In the present study, 17 out of 57 CYP450s were found to have a fold change of at least four times in non-infected HCC (Fig. 2A). It was, later on, demonstrated that expression level variation of CYP450s is relatively constant between HBV, HCV or HBCV infected tumor compared to the non-infected tumor ($r=0.76-0.88$) (Fig. S2B and C). A global look at their expression level across normal and HCC tissues, as seen in a heatmap representation, shows that samples have a tendency to cluster together, consistent with their type (i.e., normal or cancer) (Fig. 2B), suggesting that HCC tissues could be identified according to their CYP450 expression level. Significantly dysregulated CYP450 were then selected following statistical filters as described previously. Since some of the remaining genes were detected at a low level in every sample, a criterion of a mean expression of at least 2 TPM in one or the other condition was added to make sure the gene would be detectable effectively for screening. CYP1B1, CYP7A1, CYP17A1, and CYP19A1 were then found to be overexpressed, and CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP26A1 repressed in hepatocellular carcinoma, compared to their expression in normal liver tissues (Fig. 2C).

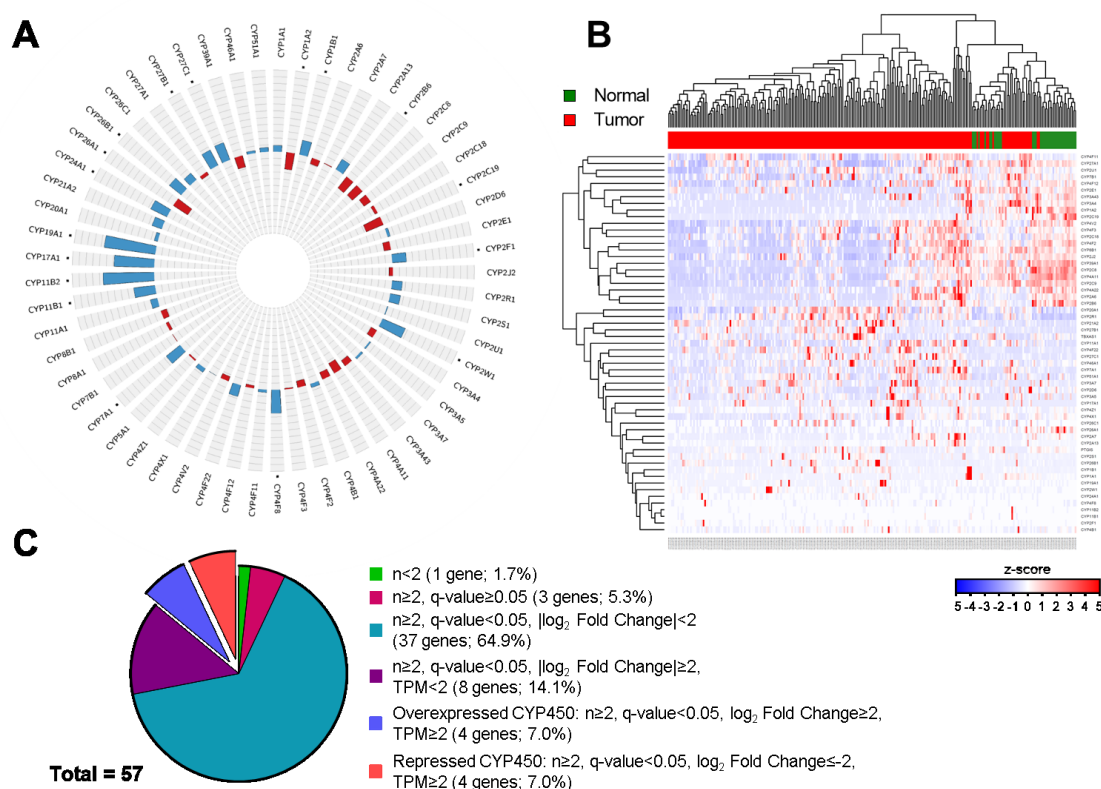


Figure 2. Global profiling of the cytochromes P450 expression landscape in hepatocellular carcinoma. (A) Gene expression variation of the 57 cytochromes P450 in tumor tissues compared to normal tissues, both non-infected by hepatitis viruses. Dots indicated fold change (in log2) of at least -2 and 2. Overexpression values are shown in blue and repression values in red, and the scale is from -12 to 12. (B) Heatmap representation of cytochromes P450 gene expression for each normal (green) and tumor (red) non-infected samples. Red indicates high levels and blue indicates low levels of gene expression. (C) The cytochromes P450 list was filtered to keep those with significant expression variation in HCC. Using this approach, we identified eight cytochromes P450, four of them were up-regulated (blue part; CYP1B1, CYP7A1, CYP17A1, and CYP19A1), while four were down-regulated (orange part; CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, and CYP26A1) in tumor cells compared to normal cells.

Since fold changes were calculated from average expression level in normal and tumor tissues, their expression in individual samples was investigated. Global gene expression distribution was still significantly different between normal and tumor tissues (Fig. 3A). To confirm that differences in gene expression are not due to interindividual variability, the expression level of each gene in paired tissues (normal and tumor) was evaluated (Fig. 3B). Up- and down-regulation of candidate CYP450s in cancer tissues was still statistically significant for the selected CYP450s, except for CYP19A1. This is attributed to the fact that

CYP19A1 was not detected in the majority of the samples, although 2 paired samples exhibit a high overexpression in tumors. HCC samples were then separated according to their pathologic stage to evaluate de expression variation of these eight CYP450s during the progression of cancer (stage I to IV). The differences observed between the stages are not statistically significant, mainly due to a wide disparity of the sample in these groups. The analysis indicates that the change of expression discovered in HCC occurs from stage I and is relatively constant during cancer progression (Fig. S4A). This suggests that the identified CYP450s could be suitable biomarkers for early identification of HCC.

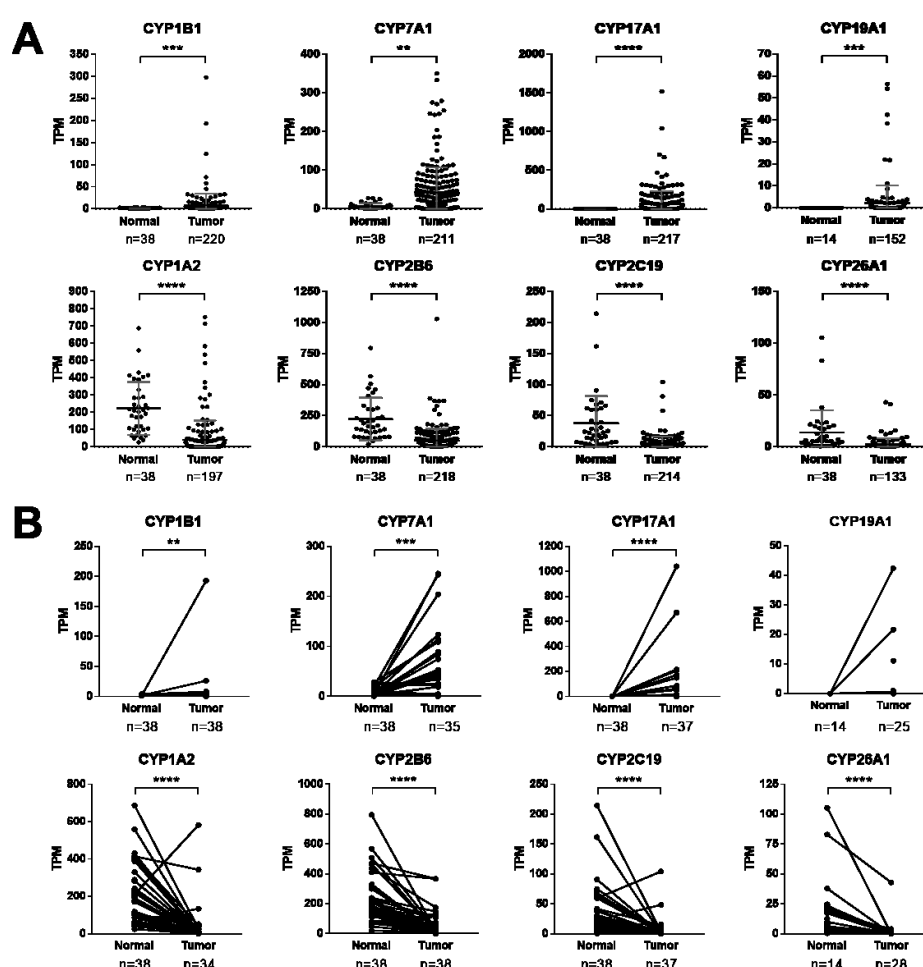


Figure 3. Specific gene expression analysis of the eight cytochromes P450 between hepatocarcinoma and normal tissues. (A) Gene expression, in transcripts per million (TPM), in each tumor and normal tissues samples, of the eight cytochromes P450 that were significantly up or down-regulated. Grey lines indicates mean \pm standard deviation in each groups. Mann-Whitney U test. (B) Gene expression, in TPM, of the eight cytochromes

P450 in paired tumor and normal tissues samples. Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ****=p<0.0001.

Candidate cytochromes P450 expression validation and their diagnosis characteristics

To validate the differential expression of CYP450 previously identified by RNA-Seq, qPCR assays were performed on an independent samples cohort. Commercially available cDNA plates were generated from 8 normal and 22 HCC tissues from which RNA was extracted and converted into cDNA. Among those samples, there are 6 paired samples which allowed validation of intraindividual expression variation (Fig. S3B). These qPCR results confirmed a similar distribution of gene expression; indeed overexpression of CYP1B1, CYP7A1, CYP17A1, and CYP19A1, and repression of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP26A1 was observed in cancer tissues (Fig. S3A). However, since some tumors have relatively normal gene expression level and there is interindividual variability in samples, the difference in CYP1B1 and CYP7A1 expression between normal and cancer tissues were not considered statistically significant.

The use of qPCR assays validated significant changes in gene expression level of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP26A1, CYP17A1 and CYP19A1 in HCC tissues previously identified by RNA-Seq. These genes were then selected to evaluate their potential to discriminate between HCC and normal samples. For this, receiver operating characteristics (ROC) curves presenting the sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) at each expression level threshold were drawn, and the area under the curve (AUC) was determined for each gene. A value of AUC close to 1 indicates that the test classifies the samples as normal or cancer correctly, while an AUC of 0.5 indicates no predictive power. Then, an expression threshold that maximizes both sensitivity and specificity was identified for each gene (Fig. 4A). These parameters are both important in this type of test since a high sensitivity allows the detection of all pathologic samples while a high specificity assures to be negative to all normal samples. The overexpression of a gene is usually easier to detect in a biological sample for pathology diagnosis. However, this analysis revealed, just as previous results in this study, that some HCC do not overexpress CYP17A1 or CYP19A1. This lead to a modest sensitivity of the screening test based on the expression level of these

genes. However, this does not exclude the possibility that CYP17A1 or CYP19A1 could be adequate biomarkers for a subset of HCC. To ensure confident identification of HCC tissues according to a gene expression level, the genes with an AUC of at least 0.95 and sensitivity and specificity of 90% or more at the establish threshold were considered adequate. Using these criteria, 3 repressed CYP450 were selected: CYP2B6 (AUC: 0.9821, sensitivity: 90.5%, specificity: 100%), CYP1A2 and CYP2C19, with the last 2 genes that classify perfectly (AUC: 1, sensitivity: 100%, specificity: 100%) normal and HCC tissues (Fig. 4B).

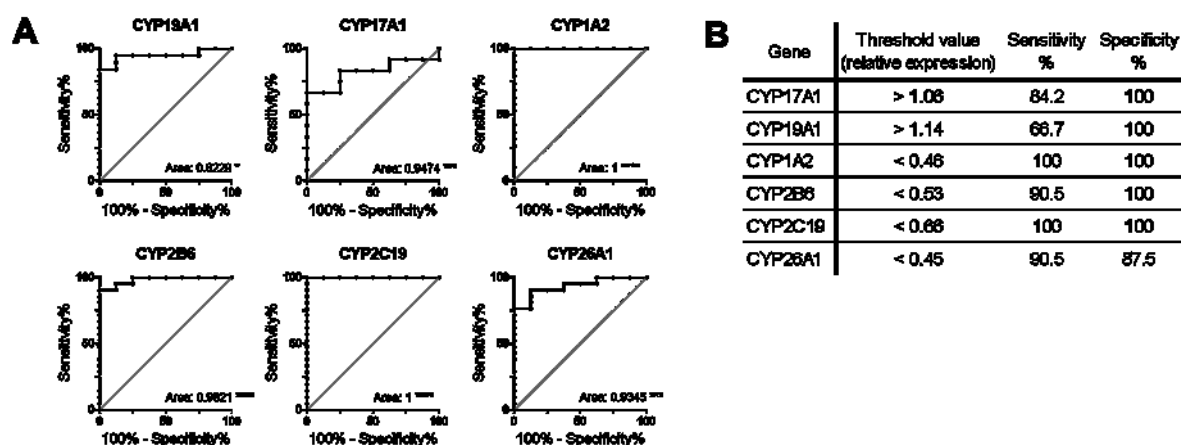


Figure 4. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of candidates cytochromes P450 for HCC identification. (A) ROC curve of relative expression of HCC (n=22) and normal (n=8) cDNA samples for each validated dysregulated genes, which are CYP 17A1, 19A1, 1A2, 2B6, 2C19 and 26A1, and the corresponding area under the curve (AUC) value. Diagonal line represent the performance of a random classifier. *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ****=p<0.0001. (B) Relative expression threshold that maximize both sensitivity and specificity for each genes.

Protein level of potential biomarkers in HCC and their fold change across cancers

The expression of CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19 at mRNA level was shown to discriminate HCC from normal samples, but, ultimately, a screening test based on the protein expression level of these genes would be preferred for clinical application. To evaluate this possibility, the protein expression levels of the selected candidates were investigated in healthy and HCC liver tissues using immunohistochemistry data of The Human Protein Atlas. Each gene was detected by a specific antibody coupled to a horseradish peroxidase detection system that produces a brown precipitate. The quantity and intensity of the coloration can be positively correlated with the expression level of the protein. It was shown that expression

of these 3 genes is repressed at the protein level in cancer tissues since the intensity of the brown coloration is lower than in normal tissues (Fig. 5A).

Finally, to evaluate if the dysregulation of these genes is unique to HCC or could be found in other cancers, fold changes were calculated in different types of tumors compared to their normal tissues (number of samples are shown in Fig. S4B). RNA-Seq data, obtained from National Cancer Institute Genomic Data Commons (GDC) Data Portal, of liver, bladder, breast, head and neck, kidney, lung, prostate, stomach, uterine, and brain normal and cancer tissues were then compared. It should be noted that these mRNA expression level were, at this time, quantify in FPKM-UQ rather than TPM, which can cause little variation in fold change calculated previously with CYP450 genes in liver cancer. This showed that each of these cancers has a distinct pattern of expression variation, at least for CYP1A2, CYP2B6 and CYP2C19 (Fig. 5B). The repression of these 3 genes is then particular to hepatocellular carcinoma, and their use as biomarkers would then be specific for this type of cancer.

A global look at the 57 CYP450 expression variation across these 10 cancers showed a similar conclusion, which is that every cancer has a specific signature in regards to the expression of cytochromes (Fig. S4C). Nevertheless, it is possible to see that CYP2W1 is overexpressed in all cancers, except in prostate adenocarcinoma (PRAD). As mentioned previously in others studies, this CYP450 could be used as a biomarker to screen for tumor presence but also in treatments since it can activate pro-drug only where it is expressed in cancer cells[20–22]. Note that this gene was excluded of potential biomarkers for HCC in this study since the up-regulation in paired samples was not statistically significant ($p=0.500$) and that the expression level in these samples was inferior to 2 TPM. A similar pattern can be observed for CYP4F8, which is up-regulated in all cancers, except PRAD and head and neck squamous cell carcinoma (HNSC).

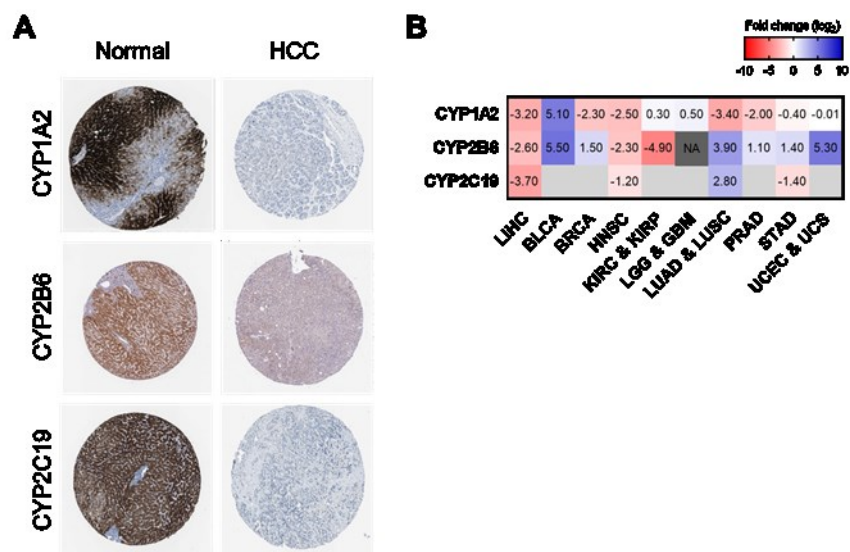


Figure 5. Investigation of potential biomarkers at protein levels in HCC and expression fold change across cancers. (A) Protein expression of potential biomarkers genes CYP1A2, CYP2B6 and CYP2C19, detected by immunohistochemistry, in normal liver and HCC tissues. These images were extracted from the Human Protein Atlas database, according to its academic usage permission (www.proteinatlas.org). (B) Fold change of CYP1A2, CYP2B6 and CYP2C19 expression (log₂ gene expression, in FPKM-UQ, fold change) in different cancers (liver hepatocellular carcinoma, urothelial bladder carcinoma, breast invasive carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, kidney renal clear cell carcinoma and kidney renal papillary cell carcinoma, brain lower grade glioma and glioblastoma multiforme, lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma, prostate adenocarcinoma, stomach adenocarcinoma, uterine corpus endometrial carcinoma and uterine carcinosarcoma). Number of normal and cancer samples are presented in figure S4B. Overexpression are shown in blue and repression in red. Grey positions are missing data, and NA indicates the impossibility to determine a fold change because the gene was not detected in normal samples.

Discussion

Advances in genomics technologies allow characterization of molecular events occurring during carcinogenesis, such as mRNA expression dysregulation that could lead to the identification of new biomarkers. In the present study, gene expression variation of CYP450 family genes was investigated in hepatocellular carcinoma tissues compared to normal liver tissues by RNA-Seq data analysis. Following rigorous statistical analysis of expression variation and validation assays, 3 new potential biomarkers for HCC were identified, which are CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19.

The identification of differentially expressed CYP450s in HCC are in agreement to other large-scale studies that also identified CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, and CYP26A1 among the repressed genes, and CYP7A1, and CYP19A1 as overexpressed in HCC tissues[23–26]. However, rather than only identify significant fold changes in gene expression, this study used stringent statistical filters and looked at the expression level of normal and cancer samples individually and in paired tissues when applicable. The significant expression variation identified by RNA-Seq were also validated in an independent set of samples by qPCR. Finally, the ability to discriminate HCC from normal samples of the resulting potential biomarker genes were evaluated. CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19 are then promising new biomarkers for HCC identification, according to both their mRNA and protein expression levels.

Previous studies have also identified various CYP450s as interesting for cancer screening or treatments. For instance, CYP2J2 and CYP2W1 were both found to have a higher level of expression in carcinoma and transformed tissues where they could have a role in the progression or treatment of cancers[20, 27]. CYP1B1 is one of the best-known CYP450s up-regulated in multiple cancers, like breast, colon and brain cancer[28], and studies are in progress to use it as a therapeutic target in the treatment of cancers[29]. Moreover, CYP17A1 has also been extensively characterized, both at the mRNA and protein levels, in tissues and sera of HCC patients. A previous study showed that a threshold of 60.2ng/mL allows identification of HCC patients with a sensitivity and specificity of 86.9% and 76.8% respectively, while a combination with AFP achieved 90.1% and 80.3% of sensitivity and specificity[30].

In addition to the identification of CYP450s as markers for hepatocellular carcinoma, the roles of CYP450s in carcinogenesis merits further investigation. Indeed, CYP1A2, CYP2B6,

and CYP2C19, which are repressed in HCC, are involved in the metabolism of eicosanoids, drugs, and foreign chemicals[17]. This could potentially promote HCC development by an accumulation of toxic compounds for cells. Interestingly, CYP1A2 is the major CYP450 found in the liver and is involved in the metabolism of 8.9% of drugs used in the clinic, while CYP2B6 and CYP2C19 are involved in the metabolism of 7.2% and 6.8%, respectively of these drugs[31]. The lower levels of these enzymes in HCC patients could then have an impact on their susceptibility to drugs doses or the activation of pro-drugs. Similarly, CYP1B1 is generally absent from normal adult liver and its expression is associated with carcinogenesis, partly because it can activate pro-carcinogens[32]. On the other hand, CYP26A1, which is repressed in HCC, is involved in retinoic acid inactivation, [17]. It is therefore possible that products, such as retinoic acid, would have a role in the progression of HCC since a previous study revealed that vitamin A deficiency, which could result from a CYP26A1 depletion, is associated with increased susceptibility to carcinogenesis[33]. Finally, in hormone-dependent prostate and breast cancers, CYP17A1 and CYP19A1 are targeted by inhibitors for cancer treatments[34, 35]. In the case of HCC, different studies showed that a high level of estrogens would be protective for patients, which can correlate with the fact that HCC is much more present in men than women[36, 37].

Several studies are seeking the identification of new HCC biomarkers. Some of these potential markers such as AFP lectin-bound (AFP-L3)[38], Des- γ -carboxy prothrombin [39], or glypican-3 (GPC3)[40], have interesting diagnosis performances. Despite a large number of promising molecules, individual markers generally lack sensitivity and/or specificity to be sufficiently effective. The future of HCC screening will most likely involve the use of a combination of biomarkers based on various macromolecules such as mRNAs, proteins, mi-RNAs, or even powerful imagery techniques such as ultrasonography.

Conclusion

The present study identified over 4,000 dysregulated genes in hepatocellular carcinoma, with some of them belonging to the CYP450 family. CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19 showed promising characteristics for HCC identification in patients.

Materials and methods

RNA-Seq data

RNA-Seq expression data files were obtained from the National Cancer Institute Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov>). Expression data was imported from two analysis format: transcripts per million (TPM) and upper quartile fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM-UQ). TPM data was derived by read alignment using Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) on GRCh37/hg19 reference genome, and quantification using RSEM (<https://deweylab.github.io/RSEM>). TPM data at the GDC is available as legacy archive (<https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive>) as it was originally obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) data portal, now superseded by GDC. FPKM-UQ data workflow involves read alignment on GRCh38 reference genome using STAR (<https://github.com/alexdobin/STAR>) and quantification following the Genomic Data Commons workflow (https://docs.gdc.cancer.gov/Data/Bioinformatics_Pipelines/Expression_mRNA_Pipeline).

Gene Expression Analysis

Analyses were performed on the transcriptomic data of 220 hepatocellular carcinoma (HCC) and 38 normal liver tissues, uninfected by hepatitis B virus and/or hepatitis C virus, generated by The Cancer Genome Atlas (<http://cancergenome.nih.gov/>). The list, containing the 23,393 detected genes, was filtered to keep only data with at least two replicates for both normal and tumor samples. Fold changes between average transcripts per million (TPM) of tumor tissues compared to normal tissues and q-value were calculated. A positive fold change value indicates that the gene is overexpressed in HCC while a negative value indicates its repression. Data for which the q-value were under 0.05 and fold change in base 2 logarithm equal or higher than 2 in absolute value were considered significant and were kept (4,205 genes). For cytochromes P450, similar criteria were used, and a cut-off of a mean expression of at least 2 TPM in one or the other condition was added to allow efficient detection of the transcript in samples.

Gene ontology analysis

Enriched biological processes in filtered gene list were determined by using the database for annotation, visualization and integrated discovery[41, 42] (DAVID, V6.7, <https://david.ncifcrf.gov/>). All 23,393 detected genes were used as background and 75 repressed genes were analyzed.

String Networks

The list of 75 repressed genes was submitted to the STRING database[43] (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, version 10.0, www.string-db.org) to produce a protein-protein interactions network, from the *Homo sapiens* interactome.

Determination of target genes expression by qPCR on cDNA samples

TissueScan Liver Cancer cDNA Arrays from OriGene Technologies (cat. LVRT301; Rockville, MD, USA) were assessed for the expression of dysregulated cytochromes P450 using the manufacturer's protocol. The plates contained cDNAs from 8 normal and 22 hepatocellular carcinomas tissues, from which 6 normal and HCC samples are paired, and were analyzed by quantitative PCR (qPCR). All forward and reverse primers were individually resuspended to 20–100 μ M in Tris-EDTA buffer (IDT) and diluted as a primer pair to 1 μ M in RNase DNase-free water (IDT). Primer design and validation were evaluated as described previously[44] and the amplified products were analyzed by automated chip-based microcapillary electrophoresis on Labchip GX Touch HT instruments (Perkin Elmer). qPCR reactions were performed in 10 μ l in 384 well plates on a CFX-384 thermocycler (BioRad) with 5 μ L of 2X iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), 10 ng (3 μ l) cDNA, and 200 nM final (2 μ l) primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 3 min at 95°C; 50 cycles: 15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework[45] and the housekeeping genes YWHAZ, MRPL19 and SDHA for human cDNA. For every PCR run, control reactions performed in the absence of template were performed for each primer pair and these were consistently negative. Amplicon sizing and relative quantitation were performed by the manufacturer's software. cDNA samples and patients information are available at www.origene.com.

ROC Curve analysis

Receiver operating characteristics (ROC) curves, and associated area under the curve (AUC), were generated from qPCR relative expression data of significantly dysregulated CYP450, which are CYP17A1, CYP19A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP26A1, to evaluate their capacity to distinguish normal from HCC samples. Expression thresholds that maximize both sensitivity and specificity and the associated characteristics were determined for each gene.

Immunohistochemistry

The proteins of interest were detected by immunohistochemistry using specific antibodies and horseradish peroxidase detection, in healthy liver and HCC tissues. These images were extracted from The Human Protein Atlas[46], according to its academic usage permission (Data and complete protocol can be found at www.proteinatlas.org).

Statistical analysis

GraphPad Prism (version 7.03) was used for statistical analysis and ROC curves. Data are presented as mean \pm standard deviation. The distribution shape of the data was analyzed by Shapiro-Wilk test of normality. Mann-Whitney U test was used to compare two distribution groups and Wilcoxon rank sum test for paired samples. Student's *t*-test was used for qPCR analysis of paired samples. P value and q values less than 0.05 (two-tailed) were considered significant. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable. RNA-Seq data were obtained from the National Cancer Institute Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov>).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

RNA-Seq gene expression files used in this study are available at the National Cancer Institute Genomic Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive>).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (MB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. CMB holds a master scholarship from the Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke and a Canada graduate scholarship - Master awards from the Canadian Institutes of Health Research.

Authors' contributions

CMB contributed to experimental design, analysis of the data and wrote the manuscript; PT performed informatics analysis; MD performed qPCR experiments; JPP and MB contributed to experimental design and writing of the manuscript. All authors approved the manuscript.

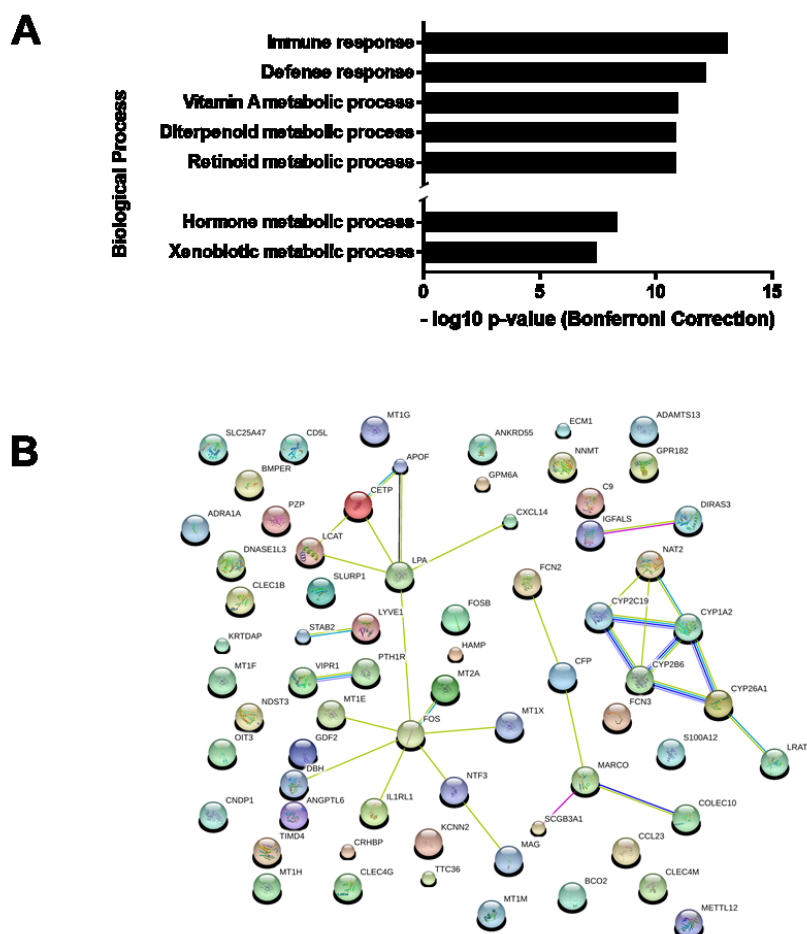
Acknowledgements

We thank all members of Pr. Perreault and Pr. Bisailon for their help, support, and advices.

Additional file

	TNoHV/NNNoHV		THBV/NNNoHV		THCV/NNNoHV		THBCV/NNNoHV	
	Log ₂ Ratio	q-value	Log ₂ Ratio	q-value	Log ₂ Ratio	q-value	Log ₂ Ratio	q-value
CYP1A1	0,91	1,1E-02	-0,18	8,5E-02	2,55	7,5E-03	-0,38	1,7E-01
CYP1A2	-2,47	1,7E-09	-4,36	1,5E-10	-1,25	5,2E-04	-4,44	5,9E-08
CYP1B1	2,15	4,3E-05	1,05	3,8E-04	4,11	3,7E-02	1,72	8,0E-02
CYP2A6	-0,89	8,3E-06	-1,36	1,8E-07	-1,17	1,6E-05	-0,66	9,6E-02
CYP2A7	-0,08	6,6E-02	0,02	1,3E-01	-1,10	9,0E-03	0,39	1,9E-01
CYP2A13	1,75	3,2E-03	1,41	2,3E-02	0,48	7,7E-02	0,92	1,4E-01
CYP2B6	-2,09	5,9E-08	-2,38	4,9E-08	-2,15	3,8E-07	-1,97	1,4E-02
CYP2C8	-1,96	6,8E-14	-2,27	3,0E-14	-2,03	1,9E-12	-1,94	8,1E-05
CYP2C9	-1,18	2,2E-13	-1,27	3,8E-13	-0,87	5,7E-06	-1,65	3,0E-03
CYP2C18	-0,44	1,7E-04	-0,82	1,5E-07	-0,54	4,1E-04	-0,01	2,3E-01
CYP2C19	-2,71	7,3E-06	-2,81	1,4E-05	-2,01	3,0E-04	-3,30	8,8E-04
CYP2D6	0,39	5,6E-03	1,36	3,0E-09	0,26	7,0E-02	0,53	1,2E-01
CYP2E1	-0,97	2,7E-07	-0,72	1,7E-04	-0,58	3,4E-03	-2,34	1,3E-02
CYP2F1	2,06	8,8E-03	0,55	6,6E-03	0,28	2,5E-02		
CYP2J2	-0,55	8,3E-10	-0,43	4,0E-05	-0,56	7,9E-07	-0,56	4,5E-02
CYP2R1	1,47	4,2E-37	1,47	5,0E-20	1,49	7,0E-12	1,54	2,9E-03
CYP2S1	1,52	3,0E-04	0,61	9,0E-03	0,90	2,2E-02	0,78	9,9E-02
CYP2U1	0,10	3,0E-02	-0,06	9,4E-02	0,05	1,0E-01	0,02	2,2E-01
CYP2W1	3,64	4,4E-05	4,20	6,8E-03	2,31	1,7E-05	2,52	4,8E-02
CYP3A4	-0,93	2,5E-05	-1,39	2,6E-06	-0,69	1,2E-02	-3,82	7,0E-09
CYP3A5	0,22	3,7E-02	0,78	1,3E-03	0,91	1,2E-02	-0,74	6,5E-02
CYP3A7	0,32	3,4E-02	0,82	1,1E-02	0,17	1,0E-01	1,70	7,6E-02
CYP3A43	-0,95	2,1E-05	-0,94	1,8E-04	-1,39	6,0E-06	-1,81	8,1E-03
CYP4A11	-1,65	1,5E-18	-1,92	3,3E-19	-1,74	1,3E-15	-1,68	1,0E-03
CYP4A22	-1,09	1,3E-05	-1,10	3,6E-05	-1,67	1,8E-06	-0,98	4,1E-02
CYP4B1	0,54	2,6E-02	-0,57	4,9E-02	0,31	8,8E-02	0,92	1,4E-01
CYP4F2	-0,96	2,7E-10	-1,08	3,0E-10	-1,06	2,5E-09	-0,68	4,5E-02
CYP4F3	-0,15	1,5E-02	-0,39	5,7E-04	-0,25	2,2E-02	-0,30	1,4E-01
CYP4F8	3,43	2,4E-03	1,52	3,8E-03	1,19	1,9E-02	3,80	
CYP4F11	0,41	7,9E-06	0,41	1,8E-03	0,75	5,1E-04	0,63	7,6E-02
CYP4F12	-0,40	1,6E-04	-0,19	4,0E-02	-0,52	3,7E-04	-0,67	4,4E-02
CYP4F22	1,69	4,5E-10	1,61	1,7E-04	1,35	8,4E-03	2,30	3,3E-02
CYP4V2	-0,71	2,9E-08	-1,21	3,8E-12	-1,04	4,9E-10	-0,57	2,7E-02
CYP4X1	0,02	7,1E-02	-0,36	2,6E-02	-0,57	3,8E-03	0,21	1,8E-01
CYP4Z1	0,64	8,8E-03	0,14	9,5E-02	-0,36	4,3E-02	1,40	1,3E-01
CYP5A1	-0,21	2,7E-02	-0,74	5,9E-04	-0,08	1,1E-01	-0,47	7,9E-02
CYP7A1	2,60	1,3E-13	2,46	1,3E-06	2,79	2,3E-04	1,13	4,2E-02
CYP7B1	-0,05	5,6E-02	-0,25	1,9E-02	0,21	4,8E-02	-0,02	2,2E-01
CYP8A1	-0,42	1,5E-02	-1,74	2,7E-08	-1,23	4,1E-05	-0,41	1,7E-01
CYP8B1	-0,86	1,2E-08	-1,00	7,7E-08	-0,91	3,8E-05	-0,94	5,0E-02
CYP11A1	1,03	4,6E-07	0,92	9,4E-05	1,20	2,7E-05	1,70	7,5E-02
CYP11B1	3,12		2,70		7,98		0,44	
CYP11B2	7,48	2,3E-02	8,47	5,3E-02	11,99	5,4E-02		
CYP17A1	5,88	2,1E-09	4,81	1,3E-04	5,01	3,4E-03	7,76	1,1E-01
CYP19A1	7,54	2,0E-04	3,85	5,7E-05	4,63	2,1E-03	9,25	1,2E-01
CYP20A1	0,51	1,1E-10	0,38	8,4E-06	0,28	2,6E-03	0,40	1,1E-01
CYP21A2	1,49	9,8E-12	1,16	4,2E-06	1,46	3,1E-04	2,48	5,2E-02
CYP24A1	2,64	3,5E-03	1,92	3,6E-02	4,67	3,4E-02	-0,21	
CYP26A1	-2,51	2,2E-04	-3,33	1,9E-04	-4,23	1,5E-04	-3,42	8,1E-03
CYP26B1	2,25	3,0E-05	1,32	2,2E-03	1,43	1,8E-02	0,79	1,3E-01
CYP26C1	1,26	3,2E-08	1,22	1,9E-03	1,27	2,6E-02	1,31	9,6E-02
CYP27A1	-0,52	4,0E-09	-0,16	1,3E-02	-0,04	1,0E-01	-0,24	1,4E-01
CYP27B1	2,51	1,5E-10	2,10	1,4E-05	1,68	2,3E-04	2,17	4,9E-02
CYP27C1	2,71	3,4E-12	2,42	1,9E-09	2,05	1,2E-03	1,97	4,5E-02
CYP39A1	-1,72	3,6E-18	-2,46	2,9E-20	-1,58	1,3E-12	-2,47	1,6E-03
CYP46A1	0,36	5,0E-03	0,01	1,3E-01	-0,02	1,2E-01	-1,13	7,3E-03
CYP51A1	0,62	5,5E-04	0,57	1,9E-03	0,44	1,7E-02	0,10	1,9E-01

Table S1. CYP450 expression in non-infected, HBV, HCV or HBCV infected HCC compared to normal non-infected tissues. Fold change (in log₂ gene expression, in TPM, fold change) and associated q-value of gene expression variation of tumor tissues compared to normal ones are shown for the 57 cytochromes P450 in four conditions (T: Tumor tissue; N: Normal tissue; NoHV: no hepatitis virus infection, HBV: hepatitis B virus infection, HCV: hepatitis C virus infection; HBCV: hepatitis B and C virus infection). 8 preliminary candidate cytochromes P450 are indicated in bold.



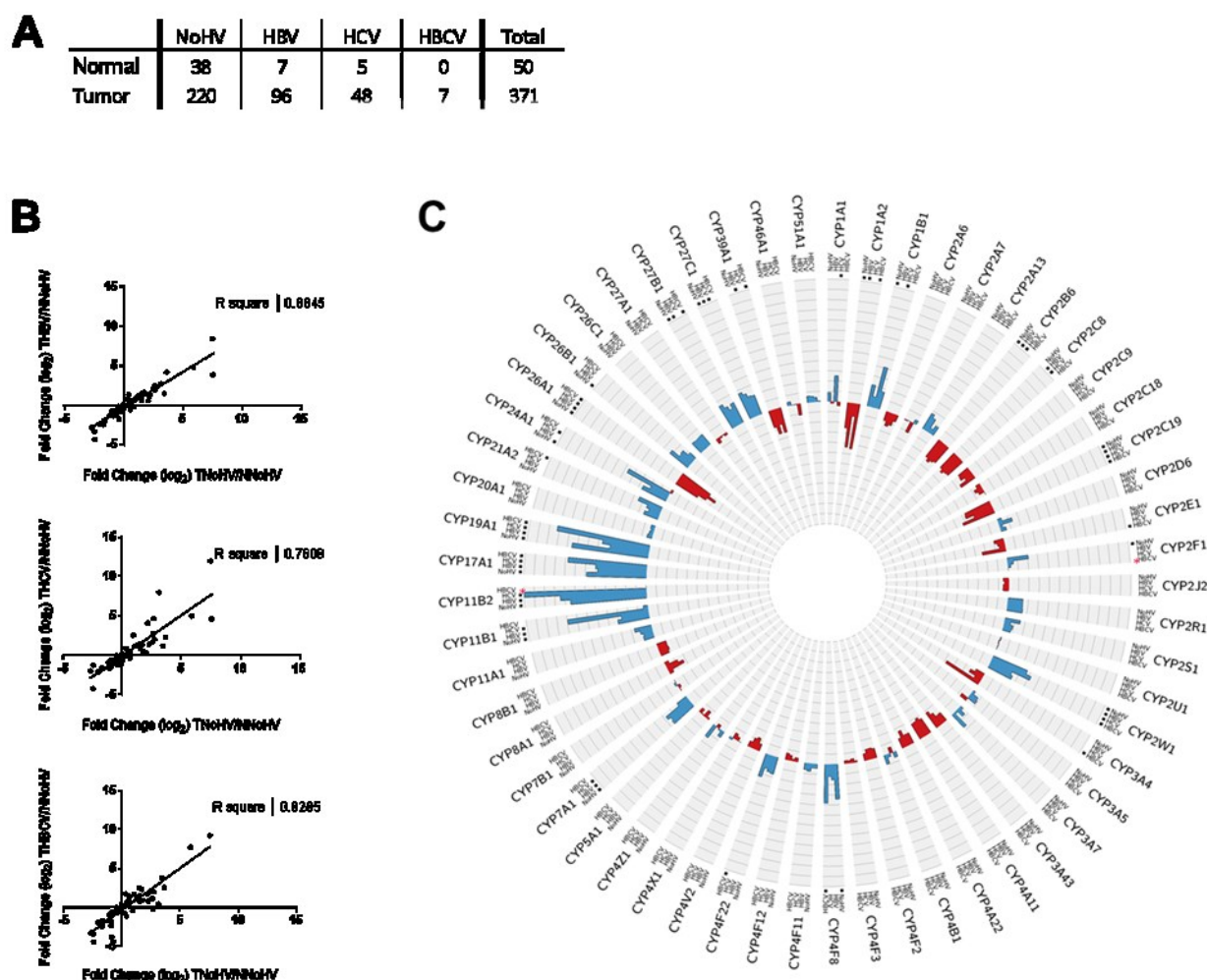


Figure S2. Expression variation profile of cytochromes P450 in HCC. (A) Distribution of non-infected (NoHV) and hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B and C viruses (HBCV) infected normal and tumor tissues samples. (B) Correlation between fold change in HBV, HCV, or HBCV and non-infected tumors, all compared to non-infected normal tissues. (C) Comparison of 57 cytochromes P450 expression fold change, compared to non-infected normal tissues, in non-infected, HBV, HCV and HBCV infected tumor tissues. Overexpression is shown in blue and repression in red, on a scale from -12 to 12. Black dots indicate a fold change of 4 or more and pink stars non available data.

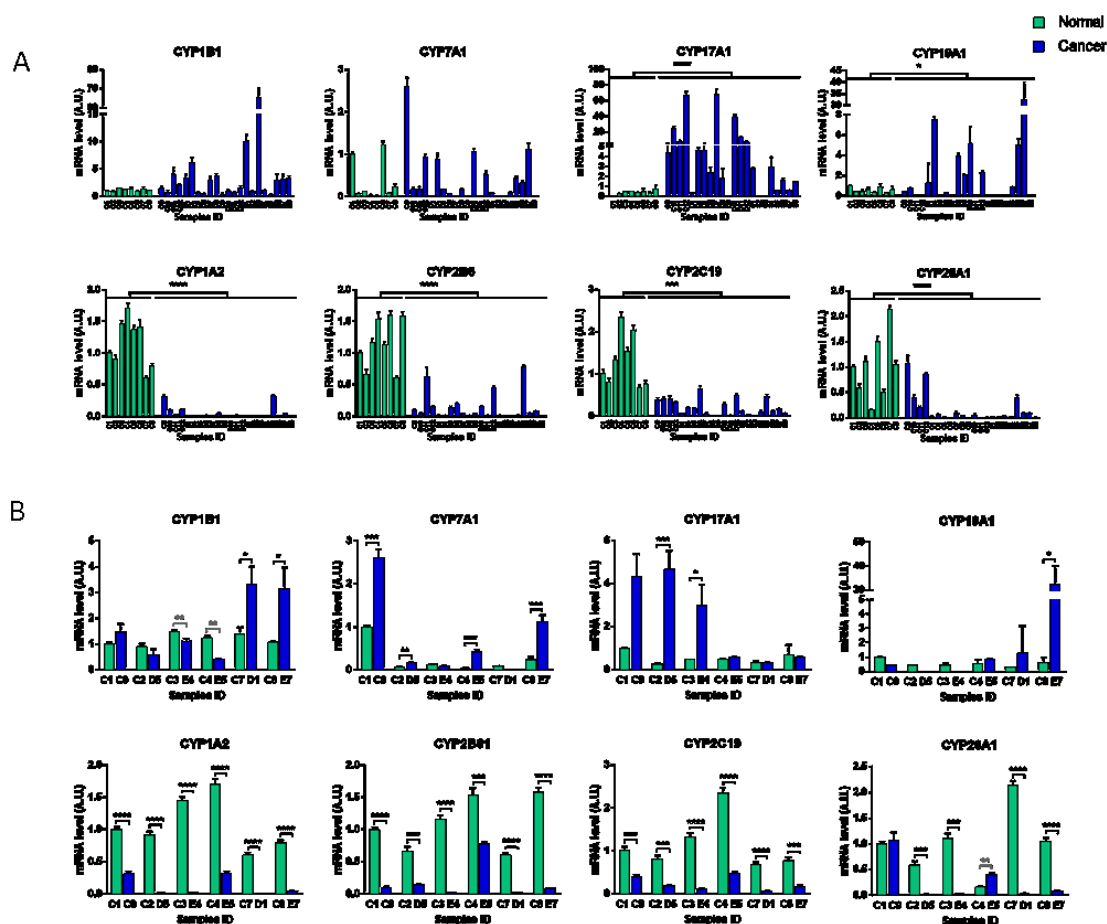


Figure S3. Validation of cytochromes P450 expression variation in HCC.

(A) Expression of up-regulated and down-regulated cytochromes P450 in HCC and normal tissue cDNA array by qPCR. Significant variation between both groups (8 normal samples (C1 to C8, green) and 22 HCC samples (C9 to E8, blue)) are shown. Mann-Whitney U test. (B) Analysis of the six paired tumor (blue) and normal (green) cDNA samples used for expression validation of cytochromes P450 by qPCR. Student *t*-test. Mean expression and standard deviation for each sample were obtained from three technical replicates and are plotted in arbitrary units. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ****= $p < 0.0001$.

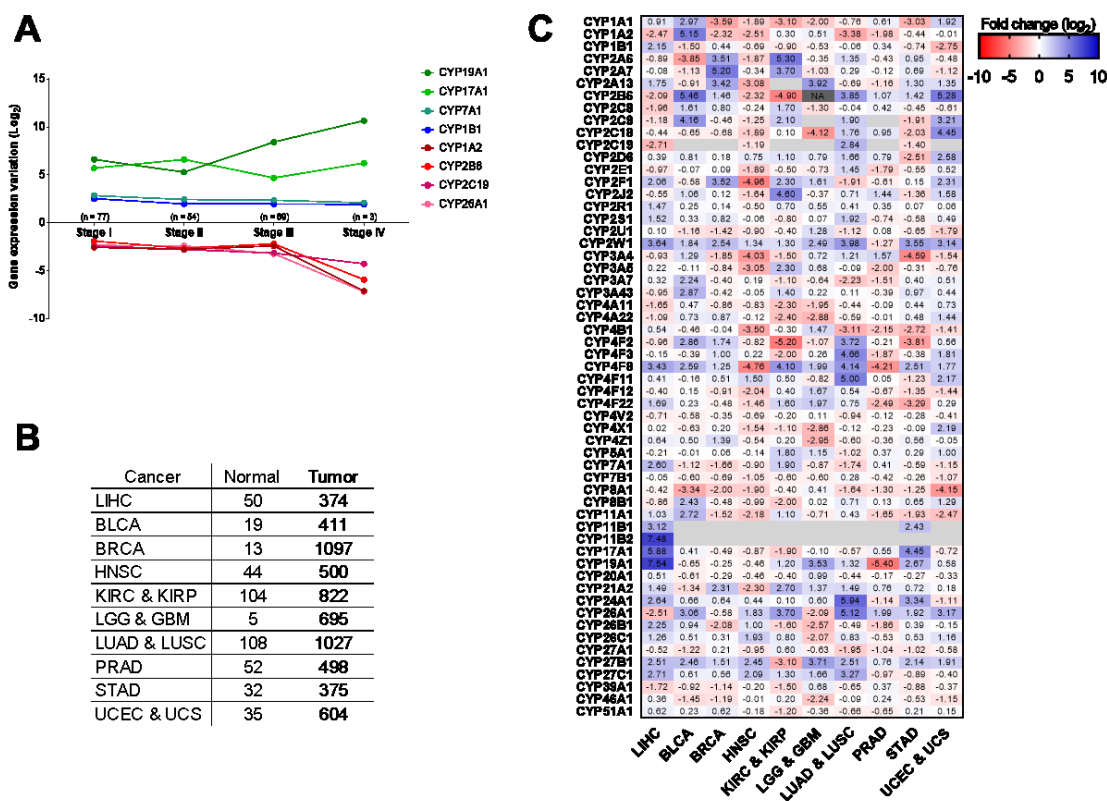


Figure S4. Investigation of cytochromes P450 characteristics across HCC stage or cancers. (A) Fold change expression of the eight dysregulated cytochromes P450 in hepatocellular carcinoma relative to their expression in normal tissues (expression in base 2 logarithm of the ratio of mean expression, in transcript-per-million, of tumor tissues on mean expression in normal tissues, both non infected by hepatitis virus) according to the pathologic stage of the tumor. (B) Number of normal and cancer samples used to determine expression variation of cytochromes P450 in 12 cancers, according to the TCGA RNA-seq data. (LIHC: liver hepatocellular carcinoma, BLCA: urothelial bladder carcinoma, BRCA: breast invasive carcinoma, HNSC: head and neck squamous cell carcinoma, KIRC: kidney renal clear cell carcinoma, KIRP: kidney renal papillary cell carcinoma, LGG: brain lower grade glioma, GBM: glioblastoma multiforme, LUAD: lung adenocarcinoma, LUSC: lung squamous cell carcinoma, PRAD: prostate adenocarcinoma, STAD: stomach adenocarcinoma, UCEC: uterine corpus endometrial carcinoma, UCS: uterine carcinosarcoma). (C) Fold change of the 57 cytochromes P450 expression (log₂ gene expression, in FPKM-UQ, fold change in tumor compared to normal tissues) in different cancers. Overexpression is shown in blue and repression in red. Grey positions are missing data, and NA indicates the impossibility to determine a fold change because the gene was not detected in normal samples.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359–86.
2. Han Z-G. Functional genomic studies: insights into the pathogenesis of liver cancer. 2012.
3. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell*. 2017;169:1327–41.
4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta Am Cancer Soc. 2016.
5. Lin S, Hoffmann K, Schemmer P. Treatment of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Liver cancer*. 2012;1:144–58.
6. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB*. 2005;7:26–34.
7. Lou J, Zhang L, Lv S, Zhang C, Jiang S. Biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin J Gastroenterol*. 2012;5:177–82.
8. Robinson PJA. Imaging liver metastases: current limitations and future prospects. *Br J Radiol*. 2000;73:234–41.
9. Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, Barbare JC, Chauffert B, Galmiche A, et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2016;463:39–44.
10. Liu C, Xiao GQ, Yan LN, Li B, Jiang L, Wen TF, et al. Value of α -fetoprotein in association with clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013;19:1811–9.
11. Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High α -fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: Significance of hepatitis virus infection, age, p53 and β -catenin mutations. *Int J Cancer*. 2004;112:44–50.
12. Lu Y, Zhu M, Li W, Lin B, Dong X, Chen Y, et al. Alpha fetoprotein plays a critical role in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2016;20:549–58.
13. Colombo M. Screening for cancer in viral hepatitis. *Clin Liver Dis*. 2001;5:109–122.
14. O'Connor GT, Tatarinov YS, Abelev G., Uriel J. A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer*. 1970;25:1091–8.
15. Kondo Y, Kimura O, Shimosegawa T. Significant biomarkers for the management of hepatocellular carcinoma. *Clin J Gastroenterol*. 2015;8:109–15.

16. Zhang C, Peng L, Zhang Y, Liu Z, Li W, Chen S, et al. The identification of key genes and pathways in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis of high-throughput data. *Med Oncol*. 2017;34:1–13.
17. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002;360:1155–62.
18. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*. 2003;123:369–75.
19. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368:20120431.
20. Karlgren M, Gomez A, Stark K, Svärd J, Rodriguez-Antona C, Oliw E, et al. Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:451–8.
21. Nishida CR, Lee M, de Montellano PRO. Efficient hypoxic activation of the anticancer agent AQ4N by CYP2S1 and CYP2W1. *Mol Pharmacol*. 2010;78:497–502.
22. Pan Y, Ong EC. Cytochrome P450 2W1 (CYP2W1) – ready for use as the biomarker and drug target for cancer? *Xenobiotica*. 2017;47:923–32.
23. Yan T, Lu L, Xie C, Chen J, Peng X, Zhu L, et al. Severely impaired and dysregulated cytochrome P450 expression and activities in hepatocellular carcinoma: Implications for personalized treatment in patients. *Mol Cancer Ther*. 2015;14:2874–86.
24. Wai-Hung Ho D, Ka-Lun Kai A, Oi-Lin Ng I. TCGA whole-transcriptome sequencing data reveals significantly dysregulated genes and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Front Med*. 2015;9:322–30.
25. Huang Q, Lin B, Liu H, Ma X, Mo F, Yu W, et al. RNA-seq analyses generate comprehensive transcriptomic landscape and reveal complex transcript patterns in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6:1–13.
26. Fan W, Ye G. Microarray analysis for the identification of specific proteins and functional modules involved in the process of hepatocellular carcinoma originating from cirrhotic liver. *Mol Med Rep*. 2018;17:5619–26.
27. Jiang JG, Chen CL, Card JW, Yang S, Chen JX, Fu XN, et al. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Res*. 2005;65:4707–15.

28. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, et al. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 1997;57:3026–31.
29. Gribben JG, Ryan DP, Boyajian R, Urban RG, Hedley ML, Beach K, et al. Unexpected association between induction of immunity to the universal tumor antigen CYP1B1 and response to next therapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4430–6.
30. Wang F, Huang J, Zhu Z, Ma X, Cao L, Zhang Y, et al. Transcriptome analysis of WHV/c-myc transgenic mice implicates CYP17A1 as a promising biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Prev Res.* 2016;9:739–49.
31. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138:103–41.
32. Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, et al. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 IBI. *Cancer Res.* 1996;56:2979–84.
33. Lotan R. Retinoids as modulators of tumor cells invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 1991;2:197–208.
34. Vasaitis TS, Bruno RD, Njar VCO. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125:23–31.
35. Del Re M, Michelucci A, Simi P, Danesi R. Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:442–50.
36. Xu H, Wei Y, Zhang Y, Xu Y, Li F, Liu J, et al. Estrogen attenuates tumour progression in hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2012;228:216–29.
37. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65:87–108.
38. Taketa K, Sekiya C, Namiki M, Akamatsu K, Ohta Ya, Endo Y, et al. Lectin-reactive profiles of alpha-fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions. *Gastroenterology.* 1990;99:508–18.
39. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo J, Lee S-D, et al. Des-γ-Carboxy (Abnormal) Prothrombin as a Serum Marker of Primary Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 1984;310:1427–31.
40. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign

hepatic disorders. *Gut*. 2001;48:558–64.

41. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4:44–57.

42. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:1–13.

43. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D447–52.

44. Brosseau JP, Lucier JF, Lapointe E, Durand M, Gendron D, Gervais-Bird J, et al. High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA*. 2010;16:442–9.

45. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8:R19.2-R19.4.

46. Uhlén M, Björling E, Agaton C, Szigartyo CA-K, Amini B, Andersen E, et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:1920–32

RÉSULTATS

Investigation des cytochromes P450 dans les tumeurs hépatiques

L'analyse du transcriptome de tissus d'hépatocarcinome a permis de démontrer que les cytochromes P450 CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 y sont surexprimés de manière importante au niveau de l'ARNm. Leur expression protéique a donc ensuite été évaluée dans les tissus humains de foie sain et cancéreux par immunohistochimie. Il s'agit d'une technique qui permet de visualiser une protéine d'intérêt sur une coupe de tissu par sa liaison à un anticorps spécifique. Celui-ci est ensuite lié par un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) qui converti son substrat, le DAB, en un précipité brun. Selon l'intensité de la coloration et de la proportion du tissu ayant réagi, il est possible de quantifier approximativement l'expression de la protéine. Donc, comme pour les CYP450 réprimés dans le HCC CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19, les résultats d'immunohistochimies contre CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 dans les tissus générés par *The Human Protein Atlas* ont été évalués. Cependant, aucune différence d'expression entre les tissus sains et cancéreux n'était répertoriée pour CYP17A1 et CYP19A1 alors que les résultats n'étaient pas disponibles pour CYP7A1. De plus, il est important de tenir compte du fait que ces échantillons de tissus proviennent de patients différents et qu'il est donc impossible de comparer l'expression protéique d'un gène dans les 2 conditions chez un même patient.

Des immunohistochimies sur 13 paires de tissus hépatiques normaux et cancéreux ont donc été réalisées pour investiguer la quantité de protéines de CYP7A1, CYP17A1, CYP19A1 et par le fait même CYP26A1, puisqu'un anticorps était disponible et que les informations étaient également absente sur *The Human Protein Atlas*.

Il a donc été observé que CYP19A1 a une légère surexpression dans les tissus de HCC dans 6 paires d'échantillons, alors que 4 ont une expression semblable et que 3 paires présentent un niveau réduit de CYP19A1 dans le tissu tumoral. En ce qui concerne CYP7A1 et CYP17A1, aucune surexpression n'est observable dans les tissus de HCC comparativement aux tissus sains et même que 9 et 10 paires de tissus présentent une répression. Finalement, CYP26A1, un gène réprimé significativement dans les tissus cancéreux, présente effectivement une

diminution que la quantité de protéines dans les tissus HCC, mais dans 5 paires de tissus, le niveau était légèrement plus élevé dans les tissus hépatiques sains (figure 5).

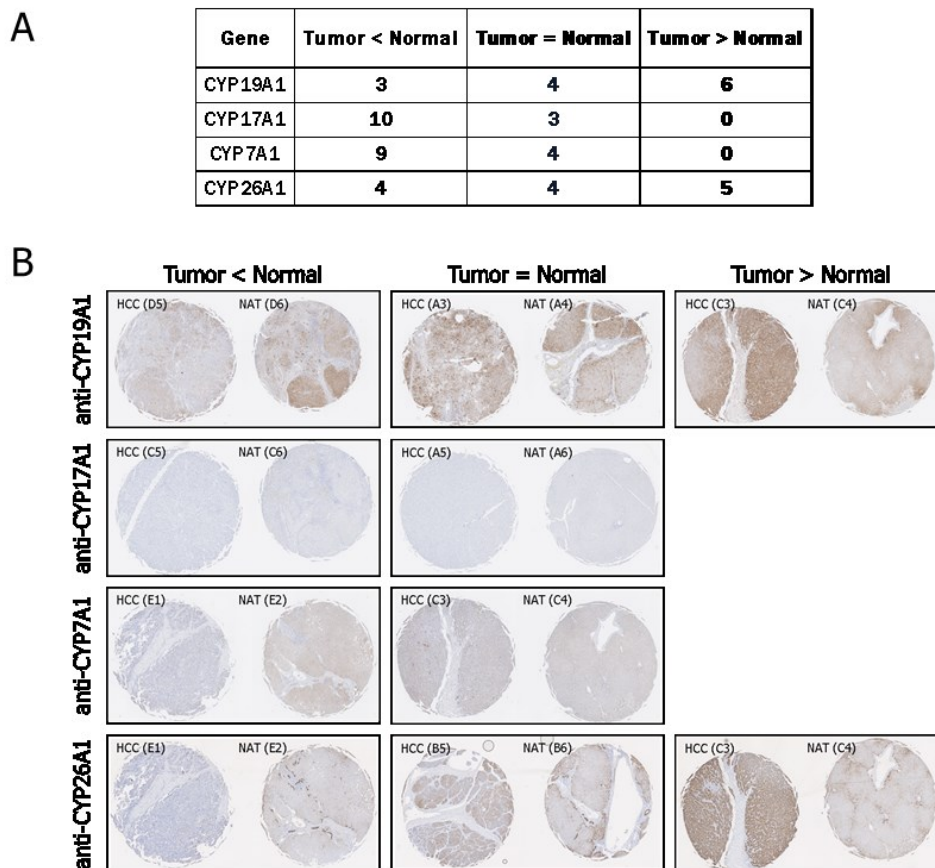


Figure 5. Immunohistochimie de CYP19A1, CYP17A1, CYP7A1 et CYP26A1 sur des tissus d'hépatocarcinomes et des tissus normaux adjacents. Les immunohistochimies ont été réalisées sur 13 paires de tissus d'hépatocarcinomes et de tissus normaux adjacents (US Biomax inc, OD-CT-DgLiv02-005) selon le protocole d'*Agilent* et leurs réactifs (*Dako EnVision+ system-HRP (DAB)*, K4011). Suite à la déparaffination des tissus sur les lames, à leur réhydratation, au démasquage des antigènes, à l'inactivation des peroxydases endogènes et au blocage des sites libres, les tissus sont incubés jusqu'au lendemain avec les anticorps primaires désirés, soit anti-CYP7A1 dilué 1:1000 (Abcam, ab79847), anti-CYP17A1 1:100 (Abcam, ab134910), anti-CYP19A1 1:500 (Abcam, ab124776) et anti-CYP26A1 1:250 (Abcam, ab172474). Un anticorps anti-lapin couplé à la HRP a été incubé sur les tissus, puis le chromogène 3,3'-diaminobenzidine (DAB) a été ajouté jusqu'à l'apparition d'un précipité brun. Les tissus ont finalement été contre-colorés à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine. (A) Résumé des immunohistochimies. Pour chacun des gènes, le nombre de paires de tissus dont l'intensité de la coloration est plus forte pour les tissus normaux, cancéreux ou dont la coloration est similaire est indiqué. Un exemple pour chacun des cas est présenté en (B) (HCC : Hépatocarcinome, NAT : tissu adjacent normal (*normal adjacent tissue*)). L'identification des tissus sur les lames et l'ensemble des résultats en présenté à l'annexe 3.

Étant donné le nombre limité d'échantillons d'ADN complémentaires utilisés pour évaluer les capacités des cytochromes P450 à distinguer les tissus sains et les tissus d'hépatocarcinome, le même type de processus a été réalisé avec les données d'expression obtenues par le séquençage d'ARN. Des courbes ROC ont été donc été générées selon le niveau d'expression, en ARNm, des 8 cytochromes P450 d'intérêt (figure 6). Il est ainsi possible d'observer que CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 sont ceux permettant de distinguer le mieux les types d'échantillons. En effet, l'aire sous la courbe pour ces gènes varie de 0,89 à 0,92, et les sensibilité et spécificité déterminées selon ces courbes sont entre 75 et 94%.

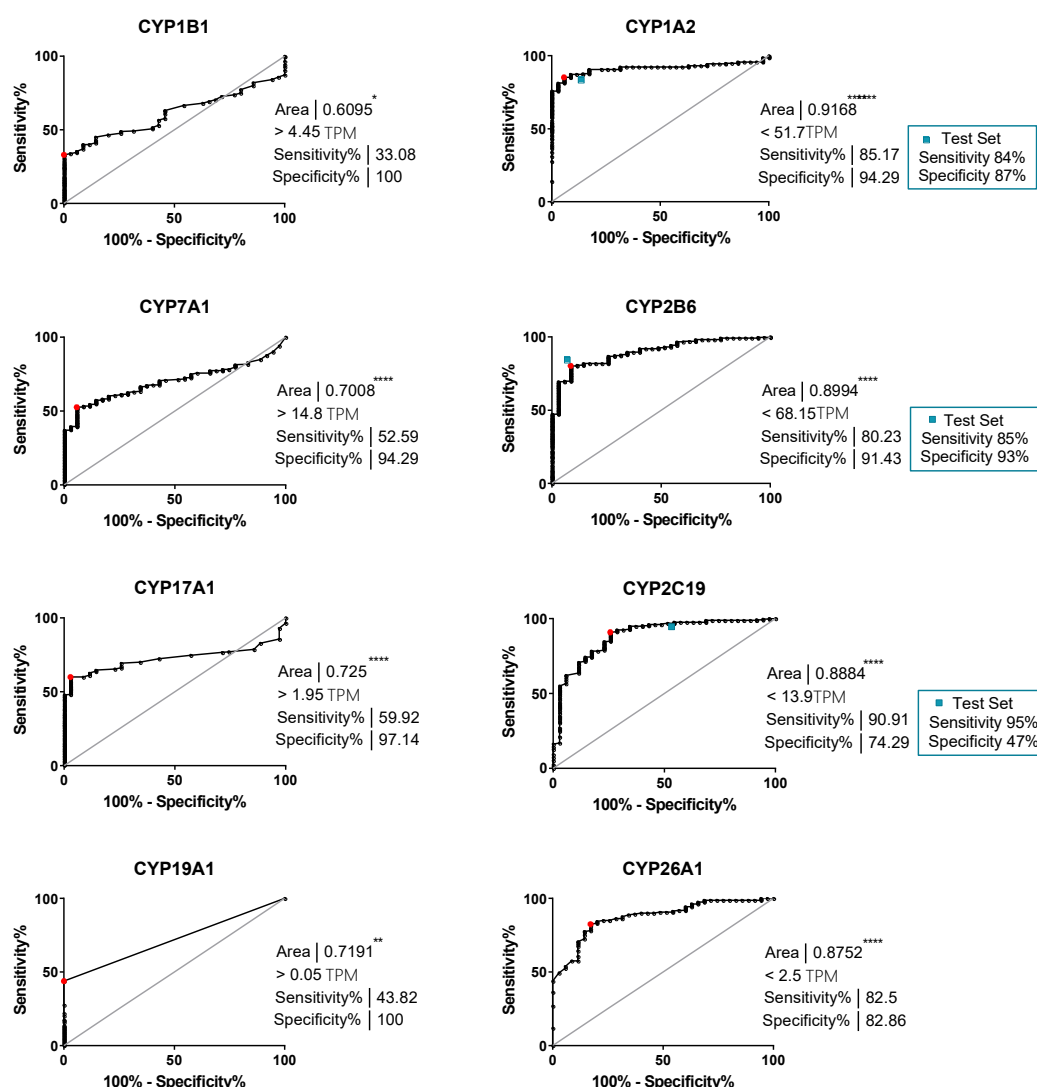


Figure 6. Courbes ROC des cytochromes P450 significativement dérégulés dans le carcinome hépatocellulaire. Les courbes ROC des cytochromes P450 candidats selon leur expression en ARNm déterminée par RNA-seq. À partir du groupe d'échantillon d'entraînement (70% des échantillons, soit 265 tissus cancéreux et 35 tissus sains), pour

chacun des seuils d'expression donné, la sensibilité et la spécificité ont été établies pour tracer la courbe. L'aire sous la courbe permet d'évaluer la performance du test à distinguer les tissus sains et cancéreux, la ligne diagonale représentant une classification aléatoire. Pour chacun des gènes, un seuil d'expression, en TPM, maximisant la sensibilité et la spécificité a été déterminé et indiqué par un rond rouge sur les graphiques. Finalement, pour les gènes ayant les meilleures performances, ce seuil d'expression a été testé dans le deuxième groupe d'échantillons (30% des échantillons, soit 111 tissus cancéreux et 15 tissus sains) et les performances associées sont indiquées par le carré bleu. *: p-value <0,05; **: p-value <0,01; ***: p-value <0,001; ****: p-value <0,0001.

Il a ensuite été envisagé que la combinaison de ces 3 gènes pourrait permettre d'obtenir de meilleures performances pour la détection des échantillons de HCC. Pour ce faire, la cohorte complète de 371 tissus cancéreux et 50 tissus sains a été séparée aléatoirement en deux groupes. Le premier groupe contient 70% des échantillons et a servi à établir les courbes ROC et le seuil d'expression, en TPM, maximisant la sensibilité et la spécificité, alors que le deuxième a servi de test et a été classifié à l'aveugle selon leur niveau d'expression de ces gènes. Individuellement, ces gènes permettent de distinguer les tissus cancéreux des tissus sains du groupe test avec une sensibilité et une spécificité variant entre 84 et 95%, excepté pour CYP2C19 qui présente une spécificité de seulement 47% (figure 6). Cependant, lorsque l'on combine ces 3 marqueurs, la totalité des 111 échantillons de HCC ont une répression d'au moins un de ces 3 gènes, alors que les 15 échantillons sains ont tous un niveau d'expression supérieure au seuil établi (figure 7).

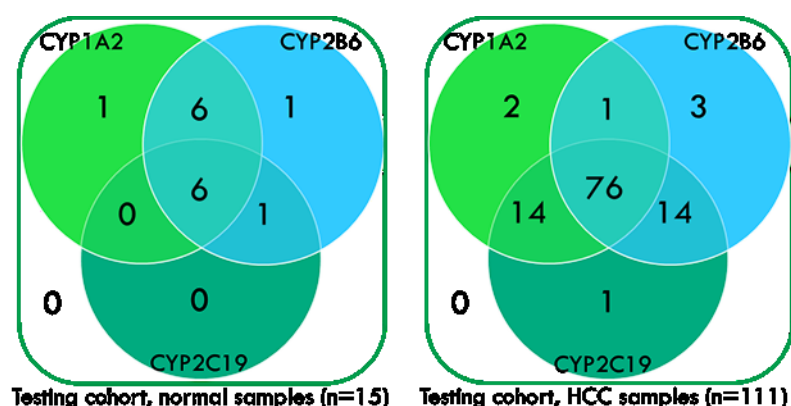


Figure 7. Classification des échantillons de la cohorte test selon leur niveau d'expression adéquat des 3 biomarqueurs potentiels. Chacun des 15 échantillons sains de la cohorte test ont été classés selon leur niveau d'expression supérieur au seuil établi préalablement, soit une expression considérée normale, pour les 3 biomarqueurs potentiels. Le même processus a été fait avec les 111 échantillons de HCC dont le niveau d'expression des gènes doit être inférieur au seuil pour être considérés cancéreux.

Évaluation du rôle des cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire via des modèles de lignées cellulaires

Outre le potentiel à être des biomarqueurs pour la détection du carcinome hépatocellulaire, les cytochromes P450 pourraient influencer le développement ou la progression du cancer. Pour investiguer si la variation d'expression des CYP450 peut moduler le phénotype cancéreux des cellules, des modèles cellulaires ont été utilisés : soit des lignées cellulaires THLE-2 (ATCC®, CRL-2706™), des hépatocytes immortalisés par l'antigène grand T du virus SV40, et HepG2 (ATCC®, HB-8065™), issus d'un carcinome hépatocellulaire.

Le niveau d'expression des 8 cytochromes P450, préalablement identifiés par RNA-seq comme étant significativement dérégulés dans les tissus cancéreux, a été mesuré par qPCR suite à leur transcription inverse (qRT-PCR) dans les deux lignées cellulaires (figure 8). Ces résultats ont démontré une surexpression significative de CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 et une répression de CYP2B6 et de CYP1B1 dans les HepG2.

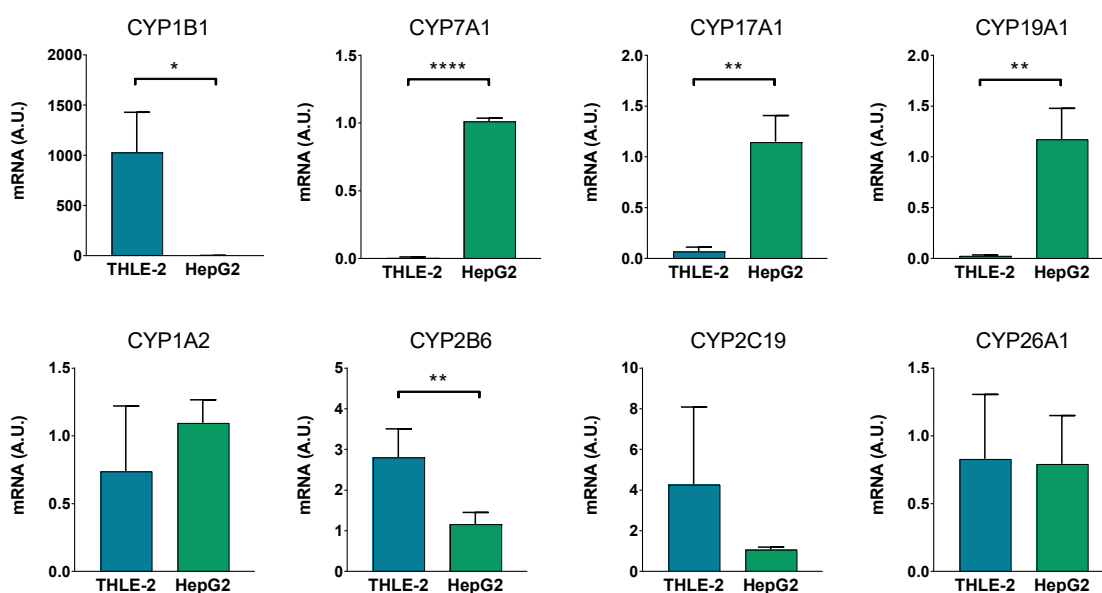


Figure 8. Mesure de l'expression des cytochromes P450 candidats dans les lignées cellulaires modèles. Mesure par qRT-PCR du niveau d'expression des cytochromes P450 préalablement identifiés comme étant dérégulés, dans les lignées cellulaires THLE-2 et HepG2. L'ARN total des cellules a été extrait avec le QIAzol™, selon le protocole de la compagnie (QIAGEN, 2009). *: p-value <0,05; **: p-value <0,01; ***: p-value <0,001; ****: p-value <0,0001. Unpaired t-test.

Pour évaluer les conséquences biologiques de la surexpression de CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 dans les hépatocytes, l'objectif serait, dans un premier temps, de réduire leur expression dans les cellules HepG2, par la transfection de petits ARN interférents (siARN). Les siRNA sont de petits ARN non codants d'environ 21 nucléotides qui se lient à la séquence d'ARNm qui leur est complémentaire pour induire sa dégradation ou inhiber sa traduction. Les siRNA sont générés à partir de longues séquences d'ARN double brin, provenant d'une source externe comme de l'ARN viral ou encore du transcrit d'un gène cellulaire, qui sont clivés en fragments par l'endonucléase Dicer. Le complexe RISC vient ensuite lier ces ARN dont les deux brins seront dissociés et l'un des deux, le brin guide, sera conservé et associé avec la protéine Argonaute. L'ARN guide permet la liaison par complémentarité de séquence à l'ARNm cible qui sera alors clivé par Ago puis ces deux fragments générés seront dégradés par des exonucléases (Carthew, Richard W. and Sontheimer, 2009; Fire et al., 1998; Kobayashi & Tomari, 2016; Nambudiri & Widlund, 2013).

Des siARN double brins peuvent donc être introduits dans une cellule afin d'induire la dégradation de l'ARNm désiré et ainsi diminuer l'expression de sa protéine. Cependant, aucune répression efficace et biologiquement significative du niveau d'expression des 3 CYP450 n'a pu être générée dans les HepG2 (figure 9).

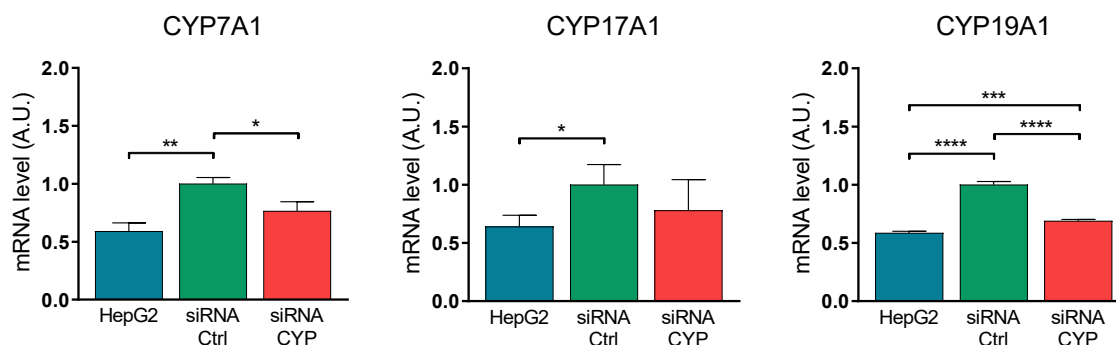


Figure 9. Validation de la répression des cytochromes P450 7A1, 17A1 et 19A1 dans les HepG2. Mesure par qRT-PCR du niveau d'expression des cytochromes P450 dans les cellules HepG2 seules (bleu), dans le contrôle négatif de transfection (*siRNA control*; vert) et dans les HepG2 transfectées avec le siARN ciblant CYP7A1, CYP17A1 ou CYP19A1 (rouge). Transfection de 20 pmol de duplex siARN dans 250 000 cellules avec 5 μ L de Lipofectamine 2000 dans une plaque de 6 puits. 24h suite à la transfection, l'ARN total des cellules a été extrait avec le tampon de lyse QIAzol™, selon le protocole de la compagnie. *: p-value <0,05; **: p-value <0,01; ***: p-value <0,001; ****: p-value <0,0001. Unpaired t-test.

En parallèle, la surexpression de CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 a été effectuée dans les cellules THLE-2 afin de voir si cela a un effet carcinogène dans des cellules normales. Pour se faire, la séquence codante de ces gènes a été clonée dans un plasmide pour expression en cellules eucaryotes, le pcDNA3.1(+), et ils ont été transfectés dans les THLE-2. Une importante surexpression a ainsi été faite dans les THLE-2 et confirmée par qRT-PCR (figure 10).

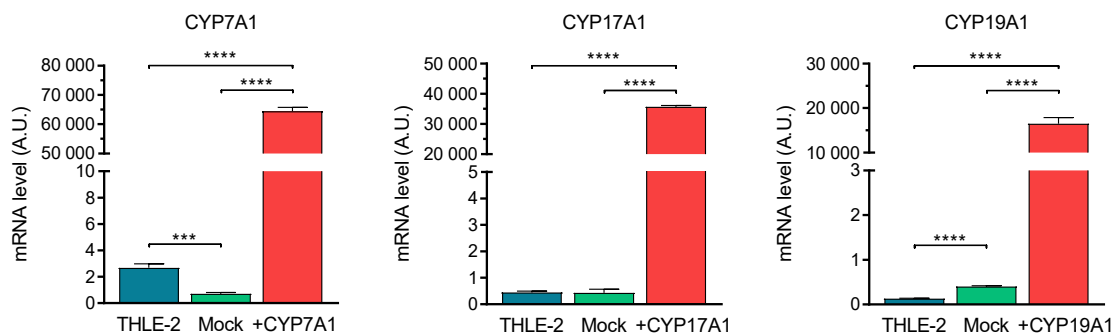


Figure 10. Validation de la surexpression des cytochromes P450 7A1, 17A1 et 19A1 dans les THLE-2. Mesure par qRT-PCR du niveau d'expression des cytochromes P450 dans les cellules THLE-2 seules (bleu), dans le contrôle négatif de transfection (pcDNA3.1(+)/*mock*; vert) et dans les THLE-2 transfectées avec le plasmide pcDNA3.1(+) contenant la séquence du gène CYP7A1, CYP17A1 ou CYP19A1 (rouge). Transfection de 1 µg d'ADN dans 100 000 cellules avec 2 µL de Lipofectamine 2000 dans une plaque de 12 puits. 24h suite à la transfection, l'ARN total des cellules a été extrait avec le QIAzol™, selon le protocole de la compagnie. Les résultats présentés sont seulement en triplicata technique du qRT-PCR. *: p-value <0,05; **: p-value <0,01; ***: p-value <0,001; ****: p-value <0,0001. Unpaired t-test.

Un essai de prolifération, avec l'indicateur alamarBlue®, a ensuite été réalisé pour évaluer si le taux de prolifération des cellules THLE-2 est augmenté lors de la surexpression des CYP450. L'alamarBlue®, un indicateur coloré qui passe de bleu à rouge suite à sa réduction par le métabolisme des cellules métaboliquement actives, a été utilisé pour cet essai. Il est donc possible de corréler le niveau d'activité métabolique, donc indirectement le nombre de cellules, avec la quantité de composé sous forme réduite, mesurée via son absorbance à 590nm (annexe 2) (Invitrogen).

Il a ainsi été possible d'observer que le métabolisme des cellules était un peu affecté par l'agent de transfection, mais que l'augmentation du niveau de CYP7A1, CYP17A1 ou CYP19A1 ne modifie pas significativement le taux de prolifération des THLE-2 (figure 11). Une augmentation significative de la quantité d'alamarBlue® réduit est observée dans les

cellules surexprimant CYP17A1 comparativement aux cellules contrôles, cependant, cette observation n'a été faite que dans un des 3 réplicats biologiques.

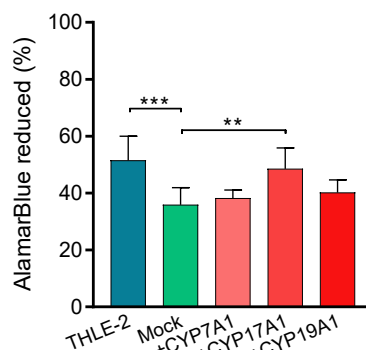


Figure 11. Essai de prolifération cellulaire des THLE-2 surexprimant les cytochromes P450 7A1, 17A1 ou 19A1. Évaluation de la prolifération cellulaire et de leur viabilité via un essai de métabolisme cellulaire où les cellules actives métaboliquement réduisent le réactif alamarBlue®. Comparaison des cellules THLE-2 seules (bleu), du contrôle négatif de transfection (pcDNA3.1(+)/*mock*; vert) et des THLE-2 transfectées 24h avec un plasmide pcDNA3.1(+) encodant CYP7A1, CYP17A1 ou CYP19A1 (rouge). Dans chaque condition, 10 000 cellules sont testées et la densité optique est mesurée 6h après avoir ajouté l'amarBlue®. Expérience réalisée en triplicata biologique, chacun en duplicata ou triplicata techniques. Comparaisons statistiques des THLE-2 transfectées avec les CYP450 par rapport aux THLE-2 *mock*. *: p-value <0,05; **: p-value <0,01; ***: p-value <0,001; ****: p-value <0,0001. Unpaired t-test.

Toutefois, les différences d'expression entre les lignées cellulaires modèles, THLE-2 et HepG2, et la modulation d'expression via la transfection des plasmides ou des siARN ont été évaluées au niveau de l'ARNm par qRT-PCR. Cependant, aucune différence d'expression au niveau protéique n'a pu être observée dans les lignées cellulaires par immunobuvardage de type western (WB) (figure 12).

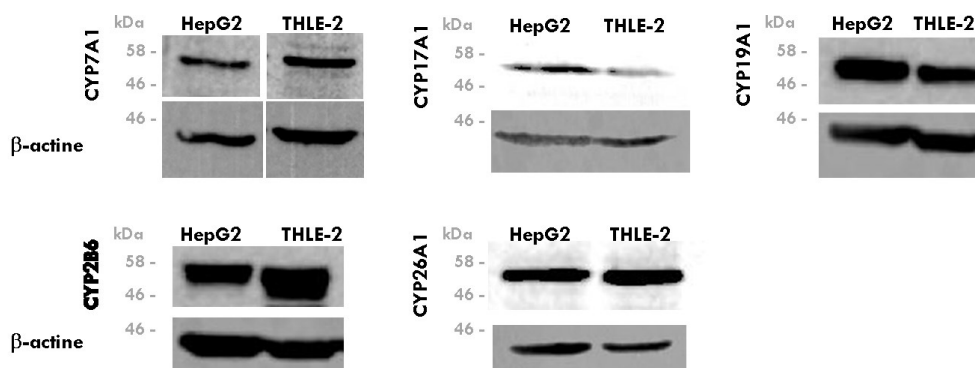


Figure 12. Évaluation du niveau d'expression protéique des cytochromes P450 dans les lignées cellulaires HepG2 et THLE-2. 10 µg ou 40 µg (anti-CYP17A1

seulement) de protéines totales des lignées cellulaires HepG2 et THLE-2 ont été récoltées et la détection des protéines d'intérêt a été réalisée par immunobuvardage de type western. Suite à leur migration sur gel SDS-PAGE et leur transfert sur membrane PVDF, les anticorps primaires anti-CYP7A1 (Abcam, ab79847), anti-CYP17A1 (Abcam, ab134910), anti-CYP19A1 (Abcam, ab124776), anti-CYP2B6 (Abcam, ab140609) ou CYP26A1 (Abcam, ab172474) dilués 1:1000 ont été incubés avec les protéines sur la membrane jusqu'au lendemain. L'anticorps anti- β -actine (Sigma, A5441) a été dilué 1:2000 et incubé 1 heure. Des anticorps secondaires anti-lapin (Thermo, 5A5-10033) et anti-souris (NEB, 7076), couplés à la HRP ont été utilisés pour la révélation par chimiluminescence.

De plus, malgré une forte surexpression de l'ARNm des CYP450 transfectés dans les THLE-2, aucune différence n'a pu être observée au niveau protéique (figure 13).

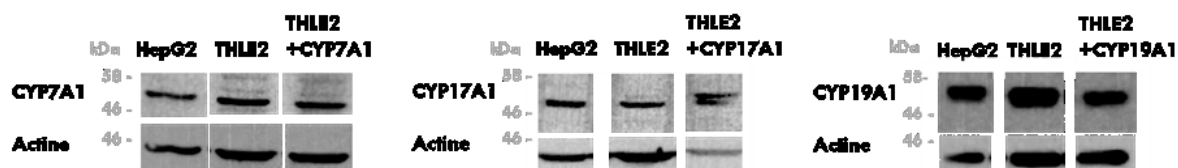


Figure 13. Évaluation au niveau protéique de la surexpression des cytochromes P450 7A1, 17A1 ou 19A1 dans les cellules THLE-2. Suite à la transfection du plasmide encodant les CYP450 7A1, 17A1 ou 19A1 (200 000 cellules dans une plaque 6 puits, 4 μ L de lipofectamine 2000, 2,5 μ g d'ADN), les protéines totales des cellules ont été récoltées et la détection des protéines d'intérêt a été réalisée par immunobuvardage de type western. 10 μ g de protéines totales pour CYP7A1 et CYP17A1 et 1 μ g pour CYP19A1 ont été incubées avec leurs anticorps primaires respectifs, anti-CYP7A1 (Abcam, ab79847) et anti-CYP17A1 (Abcam, ab134910) dilués 1:1000 ou anti-CYP19A1 (Abcam, ab124776) et anti- β -actine (Sigma A5441) dilués 1:2000. Des anticorps secondaires anti-lapin (Thermo, 5A5-10033) et anti-souris (NEB, 7076), couplés à la HRP ont été utilisés pour la révélation par chimiluminescence.

DISCUSSION

Analyse transcriptomique du carcinome hépatocellulaire

Les travaux présentés dans ce projet de recherche avaient pour objectif d'identifier des gènes dont le niveau d'expression est modifié dans les tissus de carcinomes hépatocellulaires comparativement aux tissus hépatiques sains afin d'identifier des nouveaux biomarqueurs pour ce cancer. En effet, l'alpha-fœtoprotéine, le biomarqueur actuel pour le HCC, a une sensibilité de seulement 60% et une spécificité d'environ 80%, ce qui est largement insuffisant pour son utilisation pour le dépistage de l'hépatocarcinome, alors que les nouveaux biomarqueurs identifiés, tels que l'AFP-L3 ou la DCP, semblent avoir des performances mitigées, dépendamment des études.

L'analyse du transcriptome des tissus hépatiques sains et tumoraux a permis d'identifier plus de 4000 gènes dont le niveau d'expression avait une variation d'au moins 4 fois, dont plusieurs d'entre eux appartiennent à la famille des cytochromes P450. CYP1B1, CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 ont été identifiés comme étant surexprimés, au niveau de l'ARNm dans le HCC, alors que CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 et CYP26A1 sont réprimés. Ces différences d'expression sont dues à la présence du HCC, puisqu'une variation d'expression est observable dans les tissus tumoraux et ceux issus de la marge saine chez un même patient, ce qui élimine la variabilité interindividuelle de l'expression d'un gène. De plus, ces analyses sont réalisées seulement avec les données des patients qui ne présentent aucune infection par les virus de l'hépatite B ou C, ce qui élimine les variations qui pourraient être causées par l'infection virale.

Des analyses de qPCR ont permis de valider les différences d'expression significative de 6 de ces gènes dans une cohorte indépendante d'ADN complémentaire issus de tissus hépatiques et d'hépatocarcinomes. Des courbes ROC (fonction d'efficacité du récepteur, *Receiver Operating Characteristic (ROC) curve*) ont finalement été générées afin d'établir un seuil d'expression permettant de maximiser les performances diagnostiques de ces gènes. Ceci a permis d'établir que la répression de CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 sous leur seuil respectif permet de distinguer les échantillons sains de ceux cancéreux avec une sensibilité de 90% à 100% et une spécificité de 100%.

De manière intéressante, la variation d'expression des cytochromes P450 semble spécifique au cancer du foie; elle survient dès le stade I des tumeurs, il n'y a pas de différence entre les hommes et les femmes et ces surexpressions et répressions ont également lieu chez les patients présentant une infection par les virus de l'hépatite B ou C. Ceci permettrait donc d'identifier une lésion comme étant un carcinome hépatocellulaire à un stade précoce et chez pratiquement tous les patients.

Diverses analyses supplémentaires pourraient être réalisées pour confirmer que ces gènes sont de bons biomarqueurs.

Tout d'abord, il est important de mentionner que les analyses d'expression différentielles présentées ici, soit celles avec les données de transcriptomes et celles de validation par qPCR tiennent compte de l'ensemble des transcrits produits par les gènes. Il serait donc pertinent d'étudier l'expression de chacun des transcrits de les CYP450 d'intérêts et pour vérifier s'ils subissent tous cette répression observée de manière générale. En effet, il ne serait pas impossible que certains transcrits subissent un changement d'expression contraire à celui observée de manière globale pour le gène ou encore que l'un de ces transcrit soit un biomarqueur plus sensible ou spécifique pour le HCC.

Ensuite, considérant qu'environ 90% des carcinomes hépatocellulaires se développent chez les patients présentant une cirrhose du foie, il serait essentiel de s'assurer que le niveau d'expression des gènes candidats est significativement différent dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus cirrhotiques (Simonetti et al., 1991). À ce sujet, une étude a réalisé une comparaison des transcriptomes des tissus de carcinomes et de cirrhoses du foie par micro-puce et CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 figuraient parmi les gènes significativement dérégulés dans le HCC (Fan & Ye, 2018). Ceci suggère donc que le niveau d'expression de ces gènes pourrait être suffisamment diminué pour identifier la présence d'un HCC autant dans un contexte hépatique normal que cirrhotique.

De plus, il serait essentiel de classifier à l'aveugle une autre cohorte d'échantillons de foie sains et cancéreux selon leur niveau d'expression de CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 mesuré par PCR quantitatif (qPCR) afin d'établir des statistiques de performances plus représentatives.

Toutefois, selon l'expression en ARNm des cytochromes P450, ces mêmes 3 gènes, soient CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19, sont ceux permettant de distinguer le mieux les tissus

d'hépatocarcinomes et de foie sain. De manière intéressante, la combinaison de gènes permet une classification parfaite de tous les échantillons, c'est-à-dire que chacun des échantillons de carcinome hépatocellulaire présente une répression d'au moins un de ces 3 gènes, alors que les tissus sains ont tous un niveau d'expression supérieur au seuil établi.

Ceci confirme donc que la diminution du niveau d'expression de CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 est un marqueur potentiel pour l'identification du HCC, d'autant plus lorsqu'ils sont combinés. Les plus récentes études suggèrent en effet qu'un seul biomarqueur ne pourra pas avoir de bonnes capacités à identifier un hépatocarcinome, et encore moins chez la totalité des patients (Lou et al., 2012). La tendance actuelle stipule donc qu'une combinaison de plusieurs marqueurs serait le meilleur test de dépistage pour ce type de cancer.

En ce qui concerne plus précisément le développement d'un test de dépistage basé sur l'expression de ces CYP450, ici il a été démontré qu'il est possible de mesurer leur expression en ARNm dans une biopsie de tissus par qPCR. Cependant, il serait grandement préférable d'être en mesure de quantifier leurs protéines dans le sang des patients par exemple. L'expression des protéines des CYP450 semble pouvoir être corrélée avec leur expression en ARNm, si l'on se réfère aux résultats d'immunohistochimies de tissus hépatiques sains et cancéreux du *Human Protein Atlas*, puisqu'une répression de ces protéines est également observable dans les tissus de HCC (article, figure 6). Pour le confirmer, il serait nécessaire de quantifier l'ARNm et les protéines des gènes candidats dans un échantillon de tumeur et un échantillon de la marge saine d'un même patient. Finalement, malgré quelques études qui ont détecté CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 dans le plasma d'individus sains par spectrométrie de masse, il est peu probable de retrouver ces protéines dans un échantillon biologique aussi accessible que le sang, puisqu'il s'agit de protéines associées aux membranes du réticulum endoplasmique et ne sont donc pas sécrétées (Bassani-Sternberg et al., 2010; Liu et al., 2007; Valentine et al., 2006).

Rôles des cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire

Bien qu'ils présentent des caractéristiques intéressantes pour être des biomarqueurs pour la détection du cancer du foie, à cause de leur implication dans le métabolisme ou l'activation de carcinogènes ou dans la synthèse de molécules impliquées dans des voies de

signalisation, les cytochromes P450 pourraient jouer un rôle pour le développement ou la progression du cancer.

Pour évaluer si la variation d'expression des CYP450 dans les cellules peut moduler leur phénotype, des lignées cellulaires modèles de foie normal et de carcinome hépatocellulaire ont été utilisées, soit les THLE-2 et les HepG2. Tout d'abord, il a été confirmé par qRT-PCR que ces lignées cellulaires présentent une surexpression significative de *CYP7A1*, *CYP17A1* et *CYP19A1* et une répression de *CYP2B6* dans les HepG2, ce qui concorde avec les variations observées dans les tissus des patients. De manière étonnante, *CYP1B1* est grandement réprimé dans les HepG2 comparativement aux THLE-2, alors qu'il s'agit d'un des cytochromes P450 particulièrement bien connu pour être surexprimé dans plusieurs tumeurs. Ceci peut s'expliquer par le fait que des lignées cellulaires immortalisées ne sont pas totalement représentatives d'une cellule se développant dans un organisme complet, en interaction avec divers types cellulaires, et il n'est pas impossible que des mutations surviennent au fil du temps et qu'elles soient propagées parmi les cellules filles.

Pour la suite du projet, l'objectif serait donc de modifier l'expression de *CYP7A1*, *CYP17A1* et *CYP19A1* dans les lignées cellulaires afin de voir si ces gènes peuvent influencer le phénotype des cellules.

Nos études préliminaires visaient à diminuer leur expression dans les HepG2 afin de rétablir un niveau d'expression correspondant à celui des hépatocytes sains, puisque ces gènes sont surexprimés dans l'hépatocarcinome. Pour ce faire, des petits ARN interférents, un par CYP450 d'intérêt, ont été transfectés dans les cellules. Cependant, dans ce cas-ci, cette méthode n'a pas permis de générer une répression biologiquement significative de ces 3 gènes dans les HepG2, et ce, malgré différentes conditions de transfections (nombre de cellules, quantité de siARN, temps de transfection).

D'autres méthodes devraient donc être utilisées pour réduire l'expression de ces gènes. Tout d'abord, malgré l'optimisation des conditions de transfection avec un plasmide contrôle encodant la protéine fluorescente verte (GFP), la transfection d'un ARN interférent peut nécessiter des conditions différentes, dont l'agent de transfection. Un siARN contrôle, diminuant l'expression d'un gène cible quelconque, aurait été nécessaire pour vérifier l'efficacité de la transfection et de la répression de l'expression d'un gène. D'autre part,

étant donné que l'efficacité de transfection d'un plasmide est satisfaisante dans ce type cellulaire, un plasmide encodant un shARN pourrait être généré puis introduit dans les HepG2 au lieu d'y introduire le siARN seul. Cette méthode permettrait, outre une meilleure efficacité de transfection, de sélectionner les cellules ayant acquis le plasmide via un gène de résistance, puis d'induire la transcription du shARN, qui sera éventuellement mûré en siARN, par un promoteur inductible.

D'un autre côté, la surexpression de ces 3 gènes, soient CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1, a été réalisée dans les cellules THLE-2 pour évaluer si cela a un effet carcinogène dans des cellules normales.

La surexpression de ces CYP450 dans les hépatocytes immortalisés ne semble pas avoir induit un changement phénotypique aux cellules, et un essai de prolifération a été réalisé pour évaluer si le taux de prolifération des cellules est augmenté, l'une des caractéristiques acquise pendant le processus de carcinogenèse. À la vue des résultats obtenus, il semblerait que le métabolisme des cellules THLE-2 n'est pas significativement affecté par la surexpression de ces CYP450.

Cependant, il est impossible à ce moment de conclure que le niveau d'expression de CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 ne promeut pas la carcinogenèse dans les hépatocytes. Malgré des différences d'expression significatives, au niveau de l'ARNm, des CYP450 entre les lignées cellulaires THLE-2 et HepG2 ou lors des modifications via des siARN ou des plasmides encodant les gènes, cela ne corrèle pas avec le niveau d'expression au niveau protéique. En effet, aucune différence d'expression au niveau protéique n'a pu être observée dans les lignées cellulaires par immunobuvardage de type western, et ce, malgré une grande surexpression de l'ARNm des CYP450 transfectés dans les THLE-2.

Pour vérifier si les CYP450 sont bel et bien traduits en protéines lors de la transfection des plasmides et que ce ne serait que les anticorps anti-CYP7A1, anti-CYP17A1 ou anti-CYP19A1 qui ne sont pas optimaux, une étiquette Flag a été ajoutée en N-terminal de la séquence de chacun des CYP450. Ainsi, suite à la transfection de ces constructions dans les cellules THLE-2, il sera possible de distinguer les CYP450 générés à partir du plasmide, via un anticorps anti-Flag, des CYP450 endogènes des cellules. Il sera également possible d'avoir des contrôles positifs, comme une autre construction encodant un gène quelconque avec une étiquette Flag dans le plasmide pcDNA3.1(+), pour s'assurer de la validité des résultats

obtenus et des protéines réellement reconnues par l'anticorps. Ces résultats ne sont cependant pas disponibles pour l'instant et il serait pertinent de générer les constructions de plasmide encodant les CYP450 d'intérêt mais avec l'étiquette Flag en C-terminal afin de s'assurer qu'elle n'affecte pas la structure de la protéine ou ses interactions cellulaires.

Les analyses du transcriptome de carcinomes hépatocellulaires ont démontré que les cytochromes P450 CYP7A1, CYP17A1 et CYP19A1 y sont surexprimés de manière importante. Leur expression protéique donc ensuite a été évaluée dans les tissus humains de foie sain et cancéreux par immunohistochimie. Toutefois, la banque de données *The Human Protein Atlas* ne contenait pas d'informations pour certains de ces gènes ou les données ne présentaient pas de différences d'expression dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus normaux, en plus d'être constituée d'échantillons de tissus sains et cancéreux provenant d'individus différents. Des immunohistochimies ont donc été réalisées sur des tissus appariés, soit un tissu cancéreux et un issu de la marge saine. Il a donc été remarqué que CYP19A1 est légèrement surexprimé dans près de la moitié des paires de tissus, alors qu'aucune surexpression n'est observable pour CYP7A1 et CYP17A1.

Selon les résultats actuels de la quantification de l'expression des cytochromes P450 dans les tissus hépatiques sains et cancéreux, il semble que des différences d'expression importantes et significatives des ARNm ont lieu en condition cancéreuse, mais que le niveau d'expression protéique ne corrèle pas dans tous les cas. Ce n'est cependant pas anormal comme résultat. En effet, la régulation de l'expression d'un gène peut se faire à différentes étapes, soit la régulation de la transcription et de la traduction ainsi que la dégradation des ARNm et des protéines. Ainsi, le nombre de copies d'ARNm et de la protéine correspondante corrèle dans seulement 40% des cas, avec la majorité de la régulation de l'expression des gènes ayant donc lieu au niveau de la traduction (Busse et al., 2011).

À l'égard des résultats obtenus dans cette étude, il n'est pas possible d'affirmer que les modifications de l'expression des cytochromes P450 ont un rôle dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Cependant, quelques évidences dans d'autres cancers démontrent que des molécules, dont la biosynthèse implique des cytochromes P450, auraient un rôle anti-cancéreux. En effet, CYP26A1 est impliqué dans l'inactivation de l'acide

rétinoïque et la répression de ce CYP450 pourrait donc mener à son accumulation. L'acide rétinoïque a démontré une capacité à diminuer la formation de tumeurs, à induire l'apoptose et à stimuler les fonctions immunitaires dans le cancer du côlon, en plus de diminuer l'expression de marqueurs de prolifération, comme hTert et cycline D1, et de facteurs de croissance, dont EGFR et VEGF, ce qui pourrait contribuer à inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse (Alizadeh et al., 2014; Park et al., 2010). D'ailleurs, différentes études cliniques évaluent le potentiel de l'acide rétinoïque pour la prévention et le traitement de divers cancers et un analogue, le rétinoïde acyclique, permet de prévenir la récurrence du carcinome hépatocellulaire (Muto & Moriwaki, 1984; Sakai, Shimizu, & Moriwaki, 2014).

Dans le même ordre d'idée, CYP17A1 et CYP19A1, qui sont surexprimés dans le carcinome hépatocellulaire, font partie de la voie de biosynthèse des œstrogènes, qui auraient un effet protecteur chez les patients atteints de HCC. En effet, un haut niveau d'œstrogènes réduit l'invasion des cellules tumorales, inhibe la progression du cycle cellulaire et promeut l'apoptose dans le HCC. Le rôle protecteur des œstrogènes pourrait contribuer à expliquer la prévalence moins élevée de HCC chez les femmes (Xu et al., 2012).

Finalement, CYP2C19, dont l'expression est diminuée dans le HCC, est impliqué dans le métabolisme de l'acide arachidonique, ce qui réduit l'expression de ses dérivés. Étant donné que les éicosanoïdes pro-inflammatoires, comme la prostaglandine E2, sont grandement présents dans les tumeurs et ont une habileté à promouvoir la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion et la survie cellulaire dans différents cancers, dont le carcinome hépatocellulaire, cette modulation d'expression de CYP2C19 aurait encore une fois un rôle protecteur chez les patients.

De nombreuses évidences indiquent donc un rôle central des produits des cytochromes P450 dans les processus cellulaires et leur dérégulation dans le contexte cancéreux. Un changement d'expression de ces cytochromes P450, qu'il soit induit par le processus de carcinogenèse pour promouvoir la progression ou par la cellule pour tenter de rétablir un état normal, peut donc influencer la quantité de ces métabolites qui activent ou inhibent plusieurs voies de signalisation. Considérant la surexpression des CYP450 impliqués dans la synthèse des œstrogènes et la répression de ceux impliqués dans l'inactivation de l'acide rétinoïque et dans la synthèse des éicosanoïdes dans le carcinome hépatocellulaire, ces changements pourraient être induits par une réponse de défense cellulaire pour inhiber les

processus associés aux caractéristiques des cellules cancéreuses, comme une augmentation de la prolifération, de l'invasion, de la migration, de l'angiogenèse et une inhibition de l'apoptose. Malgré que le mécanisme n'a pas été identifié, la modulation de l'expression de ces enzymes pourrait être intégrée aux études qui étudient les éicosanoïdes ou les œstrogènes comme cible pour la prévention ou le traitement de cancers.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont permis d'identifier la dérégulation du niveau d'expression de plusieurs cytochromes P450 dans le carcinome hépatocellulaire, dont la répression de CYP1A2, CYP2B6 et CYP2C19 peut être utilisée comme biomarqueur pour identifier un tissu cancéreux. Il est également possible que ces changements d'expression aient des répercussions sur les processus cellulaires, comme la prolifération cellulaire, et ils auraient possiblement un rôle protecteur pour les patients atteints du cancer du foie.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abelev, G. I. (1971). Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Advances in Cancer Research*, 14, 295–358.
- Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., & Irlin, I. S. (1963). Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*, 1(2), 174–180.
- Agúndez, J. A. G., Leedesma, M. C., Benítez, J., Ladero, J. M., Rodríguez-Lescure, A., Díaz-Rubio, E., & Díaz-Rubio, M. (1995). CYP2D6 genes and risk of liver cancer. *The Lancet*, 345(8953), 830–831.
- Alizadeh, F., Bolhassani, A., Khavari, A., Bathaie, S. Z., Naji, T., & Bidgoli, S. A. (2014). Retinoids and their biological effects against cancer. *International Immunopharmacology*, 18(1), 43–49. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.027>
- American Cancer Society. (2016). Cancer Facts & Figures 2016. *Atlanta: American Cancer Society*.
- Barth, A. I., Näthke, I. S., & Nelson, W. J. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 683–690.
- Bassani-Sternberg, M., Barnea, E., Beer, I., Avivi, I., Katz, T., & Admon, A. (2010). Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18769–18776. <http://doi.org/10.1073/pnas.1008501107>
- Beatson, G. T. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, 148(3802), 104–107.
- Bialecki, E. S., & Di Bisceglie, A. M. (2005). Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB*, 7(1), 26–34. <http://doi.org/10.1080/13651820410024049>
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <http://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Blanchard, R. A., Furie, B. C., Jorgensen, M., Kruger, S. F., & Furie, B. (1981). Acquired Vitamin K-Dependent Carboxylation Deficiency in Liver Disease. *The New England Journal of Medicine*, 305(5), 242–248.
- Bloch, K., Berg, B. N., & Rittenberg, D. (1943). The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 149, 511–517.
- Braeuning, A. (2009). Regulation of Cytochrome P450 Expression by Ras- and -Catenin-Dependent Signaling. *Current Drug Metabolism*, 10, 138–158.
- Breborowicz, J., Mackiewicz, A., & Breborowicz, D. (1981). Microheterogeneity of Alpha-fetoprotein in Patient Serum as Demonstrated by Lectin Affino-electrophoresis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 14(1).
- Brinkmann, A. O. (2011). Molecular Mechanisms of Androgen Action - A Historical Perspective. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 776). Humana Press. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-243-4>
- Brodie, B. B., Gillette, J. R., & La Du, B. N. (1958). Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annual Review of Biochemistry*, 27(3), 427–454. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.27.070158.002235>
- Brown, G. T., Cash, B. G., Blihoghe, D., Johansson, P., Alnabulsi, A., & Murray, G. I. (2014). The expression and prognostic significance of retinoic acid metabolising enzymes in

- colorectal cancer. *PLoS ONE*, 9(3), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090776>
- Bruix, J., & Llovet, J. M. (2002). Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 35(3), 519–524. <http://doi.org/10.1053/jhep.2002.32089>
- Bruix, J., & Sherman, M. (2011). Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*, 53(3), 1020–1022. <http://doi.org/10.1002/hep.24199>
- Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J. M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A. K., ... Rodés, J. (2001). Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusion of the Barcelona-2000 EASL conference. *Journal of Hepatology*, 35(3), 421–430. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.3049>
- Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473, 337–342. <http://doi.org/10.1038/nature10098>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524–15529. <http://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., ... Croce, C. M. (2005). A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 353(17), 1793–1801. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa050995>
- Carthew, Richard W. and Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Chang, I., Mitsui, Y., Kim, S. K., Sun, J. S., Jeon, H. S., Kang, Y., ... Gill, A. (2017). Cytochrome P450 1B1 inhibition suppresses tumorigenicity of prostate cancer via caspase-1 activation. *Oncotarget*, 8(24), 39087–39100.
- Chang, T. K. H., Weber, G. F., Crespi, C. L., & Waxman, D. J. (1993). Differential Activation of Cyclophosphamide and Ifosfamide by Cytochromes P-450 2B and 3A in Human Liver Microsomes. *Cancer Research*, 53(23), 5629–5637.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Cheng, J. B., Motola, D. L., Mangelsdorf, D. J., & Russell, D. W. (2003). De-orphanization of Cytochrome P450 2R1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 38084–38093. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307028200>
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50, 1955–1966. <http://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200>
- Clarke, L., & Waxman, D. J. (1989). Oxidative Metabolism of Cyclophosphamide: Identification of the Hepatic Monooxygenase Catalysts of Drug Activation. *Cancer Research*, 49(9), 2344–2350.
- Corrigan, J. J., Jeter, M., & Earnest, D. L. (1982). Prothrombin Antigen and Coagulant in Patients With Liver Disease Activity. *JAMA*, 248, 1736–1739.
- Coste, A. d. L., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.-A. A., Buendia, M.-A. A., Soubrane, O., ... Perret, C. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8847–51. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8847>
- Czekaj, P., & Skowronek, R. (2012). Transcription Factors Potentially Involved in Regulation

- of Cytochrome P450 Gene Expression. In *Topics on Drug Metabolism* (pp. 171–190). <http://doi.org/10.5772/32009>
- Del Re, M., Michelucci, A., Simi, P., & Danesi, R. (2012). Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(5), 442–450. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.08.003>
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., ... Aaronson, S. A. (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, 51(6), 1063–1070. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90592-7](http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90592-7)
- Dvorak, Z., & Pavek, P. (2010). Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metabolism Reviews*, 42(4), 621–635. <http://doi.org/10.3109/03602532.2010.484462>
- Ercole, C. J., Lange, P. H., Mathisen, M., Chiou, R. K., Reddy, P. K., & Vessella, R. L. (1987). Prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer. *Journal of Urology*, 138(5), 1181–1184. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)43543-9](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)43543-9)
- European Association for the Study of the Liver, & European Organisation for Research and Treatment of Cancer. (2012). EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56, 908–943. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Falck, J. R., Belosludtsev, Y., & Falck, J. R. (1995). 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is formed in response to EGF and is a mitogen in rat proximal tubule. *The American Journal of Physiology*, 269, F806–F816.
- Fan, W., & Ye, G. (2018). Microarray analysis for the identification of specific proteins and functional modules involved in the process of hepatocellular carcinoma originating from cirrhotic liver. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), 5619–5626. <http://doi.org/10.3892/mmr.2018.8555>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <http://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by doublestranded. *RNA in Caenorhabditis Elegans. Nature*, 391, 806–811.
- Fridman, J. S., & Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56 REV. ISS. 8), 9030–9040. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207116>
- Gambarin-Gelwan, M., Wolf, D. C., Shapiro, R., Schwartz, M. E., & Min, A. D. (2000). Sensitivity of commonly available screening tests in detecting hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *American Journal of Gastroenterology*, 95(6), 1535–1538. [http://doi.org/10.1016/S0002-9270\(00\)00883-2](http://doi.org/10.1016/S0002-9270(00)00883-2)
- Gribben, J. G., Ryan, D. P., Boyajian, R., Urban, R. G., Hedley, M. L., Beach, K., ... Nadler, L. M. (2005). Unexpected association between induction of immunity to the universal tumor antigen CYP1B1 and response to next therapy. *Clinical Cancer Research*, 11(12), 4430–4436. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2111>
- Grizzi, F., Franceschini, B., Hamrick, C., Frezza, E. E., Cobos, E., & Chiriva-Internati, M. (2007). Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 5(3). <http://doi.org/10.1186/1479-5876-5-3>

- Guengerich, F. P. (1986). Roles of Cytochrome P-450 Enzymes in Chemical Carcinogenesis and Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 46(11), 2946–2954. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.02.001>
- Guengerich, F. P., & Cheng, Q. (2011). Orphans in the Human Cytochrome P450 Superfamily: Approaches to Discovering Functions and. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 684–699. <http://doi.org/10.1124/pr.110.003525.684>
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835–840. <http://doi.org/10.1038/nature09267>
- Han, Z.-G. (2012). *Functional genomic studies: insights into the pathogenesis of liver cancer. Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 13). <http://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163752>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haurands, M., & Ullrich, V. (1985). Isolation and Characterization of Thromboxane Synthase from Human Platelets as a Cytochrome P-450 Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(28), 15059–15067.
- Heckers, M., & Ullrich, V. (1989). On the Mechanism of Prostacyclin and Thromboxane A2 Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 141–150.
- Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 6(2), 140–146. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- Hippo, Y., Watanabe, K., Watanabe, A., Midorikawa, Y., Yamamoto, S., Ihara, S., ... Aburatani, H. (2004). Identification of Soluble NH₂-Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 64, 2418–2423.
- Honkakoski, P., & Negishi, M. (2000). Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *The Biochemical Journal*, 337, 321–337.
- Hu, K. Q., Kyulo, N. L., Lim, N., Elhazin, B., Hillebrand, D. J., & Bock, T. (2004). Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma. *American Journal of Gastroenterology*, 99(5), 860–865. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.04152.x>
- Huang, H., Fujii, H., Sankila, A., Mahler-Araujo, B. M., Matsuda, M., Cathomas, G., & Ohgaki, H. (1999). β -Catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *American Journal of Pathology*, 155(6), 1795–1801. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65496-X](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65496-X)
- Huang, Q., Lin, B., Liu, H., Ma, X., Mo, F., Yu, W., ... Chen, Z. N. (2011). RNA-seq analyses generate comprehensive transcriptomic landscape and reveal complex transcript patterns in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 6(10), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0026168>
- Hudziak, R. M., Lewis, G. D., Winget, M., Fendly, B. M., Shepard, H. M., & Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1165–72.
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Research*, 1(4), 293–297. [http://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64820-3](http://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64820-3)
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., ... Marsh, C. B. (2008).

- Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, 3(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>
- Huttunen, K. M., Mähönen, N., Raunio, H., & Rautio, J. (2008). Cytochrome P450-Activated Prodrugs: Targeted Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2346–2365.
- Invitrogen. (n.d.). *alamarBlue® Assay*.
- Ishii, M., Gama, H., Chida, N., Ueno, Y., Shinzawa, H., Takagi, T., ... Kasukawa, R. (2000). Simultaneous measurements of serum α -fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. *American Journal of Gastroenterology*, 95(4), 1036–1040. [http://doi.org/10.1016/S0002-9270\(00\)00770-X](http://doi.org/10.1016/S0002-9270(00)00770-X)
- Jia, H.-L., Ye, Q.-H., Qin, L.-X., Budhu, A., Forgues, M., Chen, Y., ... Wang, X. W. (2007). Gene Expression Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 13(4), 1133–1139. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1025>
- Jiang, J. G., Chen, C. L., Card, J. W., Yang, S., Chen, J. X., Fu, X. N., ... Wang, D. W. (2005). Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Research*, 65(11), 4707–4715. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4173>
- Kandoth, C., Mclellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., ... Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333–339. <http://doi.org/10.1038/nature12634>
- Keber, R., Motaln, H., Wagner, K. D., Debeljak, N., Rassoulzadegan, M., Ačimovič, J., ... Horvat, S. (2011). Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome p450 lanosterol 14 α -demethylase (Cyp51) resembles antley-bixler syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29086–29097. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.253245>
- Kerckaert, J., Bayard, B., & Biserte, G. (1979). Microheterogeneity of rat, mouse and human α 1-fetoprotein as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis and by crossed immuno-affino-electrophoresis with different lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 576, 99–108.
- Kim, H., Choi, G. H., Na, D. C., Ahn, E. Y., Kim, G. Il, Lee, J. E., ... Park, Y. N. (2011). Human hepatocellular carcinomas with “Stemness”-related marker expression: Keratin 19 expression and a poor prognosis. *Hepatology*, 54(5), 1707–1717. <http://doi.org/10.1002/hep.24559>
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., ... Shay, J. W. (1994). Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science*, 266(5193), 2011–2015. <http://doi.org/10.1126/science.7605428>
- Kobayashi, H., & Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 71–81. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.007>
- Kohn, J. (1978). The Dynamics of Serum Alpha-fetoprotein in the Course of Testicular Teratoma. *Immunology*, 33(8), 103–107.
- Kondo, Y., Kimura, O., & Shimosegawa, T. (2015). Significant biomarkers for the management of hepatocellular carcinoma. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 8(3), 109–115. <http://doi.org/10.1007/s12328-015-0568-9>
- Kroetz, D. L., & Zeldin, D. C. (2002). Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13(3), 273–283.
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015, 951–969. <http://doi.org/10.1101/pdb.top084970.RNA>
- Lepesheva, G. I., & Waterman, M. R. (2007). Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450

- (CYP51), a P450 in all biological kingdoms Galina. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 467–477. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.018>
- Libermann, T. A., Razon, N., Bartal, A. D., Yarden, Y., Schlessinger, J., & Soreq, H. (1984). Expression of Epidermal Growth Factor Receptors in Human Brain Tumors. *Cancer Research*, 44(2), 753–760.
- Liu, C., Xiao, G. Q., Yan, L. N., Li, B., Jiang, L., Wen, T. F., ... Yang, J. Y. (2013). Value of α -fetoprotein in association with clinicopathological features of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 19(11), 1811–1819. <http://doi.org/10.3748/wjg.v19.i11.1811>
- Liu, X., Valentine, S. J., Plasencia, M. D., Trimpin, S., Naylor, S., & Clemmer, D. E. (2007). Mapping the Human Plasma Proteome by SCX-LC-IMS-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(7), 1249–1264. <http://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.04.012>
- Llovet, J. M., & Bruix, J. (2003). Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37(2), 429–442. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50047>
- Llovet, J. M., Fuster, J., & Bruix, J. (1999). Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: Resection versus transplantation. *Hepatology*, 30(6), 1434–1440. <http://doi.org/10.1002/hep.510300629>
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., ... Bruix, J. (2008). Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
- Lonning, P. E. (2004). Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 11(2), 179–189. <http://doi.org/10.1677/erc.0.0110179>
- Lou, J., Zhang, L., Lv, S., Zhang, C., & Jiang, S. (2012). Biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 5(3), 177–182. <http://doi.org/10.1007/s12328-012-0301-x>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838. <http://doi.org/10.1038/nature03702>
- Makita, K., Falck, J. R., & Capdevila, J. H. (1996). Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *Faseb J.*, 10(13), 1456–1463.
- Marrero, J. A., Romano, P. R., Nikolaeva, O., Steel, L., Mehta, A., Fimmel, C. J., ... Block, T. M. (2005). GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 43(6), 1007–1012. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.028>
- Marrero, J. A., Su, G. L., Wei, W., Emick, D., Conjeevaram, H. S., Fontana, R. J., ... Early, N. C. I. C. A. (2003). Des-Gamma Carboxyprothrombin Can Differentiate Hepatocellular Carcinoma From Nonmalignant Chronic Liver Disease in American Patients. *Hepatology*, 37(5), 1114–1121. <http://doi.org/10.1053/jhep.2003.50195>
- McIntire, K. R., Waldmann, T. A., Moertel, C. G., & Go, V. L. W. (1975). Serum α fetoprotein in patients with neoplasms of the gastrointestinal tract. *Cancer Research*, 35(4), 991–996.
- Miller, W. L. (1988). Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews*, 9(3), 295–318.
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The Molecular Biology , Biochemistry , and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(4), 81–151.

- <http://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Mizejewski, G. J. (2003). Levels of Alpha-Fetoprotein during Pregnancy and Early Infancy in Normal and Disease States. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 58(12), 804–826. <http://doi.org/10.1097/01.OGX.0000099770.97668.18>
- Munro, A. W., Girvan, H. M., & Mclean, K. J. (2007). Cytochrome P450 – redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 345–359. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.08.018>
- Murray, G. I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C. E., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D., & Melvin, W. T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*, 57(14), 3026–3031.
- Murray, M., Cui, P. H., & Zhou, F. (2010). Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Regulation of CYP Genes. *Current Drug Metabolism*, 11, 850–858.
- Muto, Y., & Moriwaki, H. (1984). Antitumor activity of vitamin A and Its derivatives. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(6), 1389–1393. <http://doi.org/10.1093/jnci/73.6.1389>
- Nakajima, M., Yamamoto, T., Nunoya, K., Yokoi, T., Nagashima, K., Inoue, K., ... Kuroiwa, Y. (1996). Role of human cytochrome P450A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metabolism and Disposition*, 24(11), 1212–1217.
- Nambudiri, V. E., & Widlund, H. R. (2013). Small Interfering RNA. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(12), 1–4. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.411>
- National Cancer Institute : Genomics Data Commons. (2018). mRNA Pipeline Analysis. [En ligne] URL https://docs.gdc.cancer.gov/Data/Bioinformatics_Pipelines/Expression_mRNA_Pipeline/#mrna-analysis-pipeline. [Consulté le 2 décembre 2018].
- Nault, J. C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., ... Rossi, J. Z. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*, 4(May), 1–6. <http://doi.org/10.1038/ncomms3218>
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., ... Waterman, M. R. (1987). The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, 6(1), 1–11. <http://doi.org/10.1089/dna.1987.6.1>
- Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 6, 947–960.
- Nebert, D. W., McKinnon, R. A., & Puga, A. (1996). Human Drug-Metabolizing Enzyme Polymorphisms: Effects on Risk of Toxicity and Cancer. *DNA and Cell Biology*, 15(4), 273–280.
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155–1162. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013a). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1612), 20120431. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431>
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013b). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1612), 20120431. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431>
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., ... Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1–42. <http://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>

- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., & Satoh, T. (2003). Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 123(5), 369–375. <http://doi.org/10.1248/yakushi.123.369>
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2–16. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>
- Oda, K., Ido, A., Tamai, T., Matsushita, M., Kumagai, K., Mawatari, S.-I., ... Tsubouchi, H. (2011). Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncology Reports*, 26, 1227–1233. <http://doi.org/10.3892/or.2011.1425>
- Ohba, T., Yano, T., Yoshida, T., Kawano, D., Tsukamoto, S., Shoji, F., ... Maehara, Y. (2012). Results of a surgical resection of pulmonary metastasis from hepatocellular carcinoma: Prognostic impact of the preoperative serum alpha-fetoprotein level. *Surgery Today*, 42(6), 526–531. <http://doi.org/10.1007/s00595-011-0090-8>
- Osanai, M., & Petkovich, M. (2005). Expression of the retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 limits programmed cell death. *Mol Pharmacol*, 67(5), 1808–1817. <http://doi.org/10.1124/mol.104.005769>
- Osanai, M., Sawada, N., & Lee, G.-H. (2010). Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. *Oncogene*, 29(8), 1135–44. <http://doi.org/10.1038/onc.2009.414>
- P.B. Danielson, B. S. P. (2002). The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), 561–597. <http://doi.org/10.2174/1389200023337054>
- Park, J. Y., Park, W. S., Nam, S. W., Kim, S. Y., Lee, S. H., Yoo, N. J., ... Park, C. K. (2005). Mutations of β -catenin and AXIN 1 genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver International*, 25(1), 70–76. <http://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0995.x>
- Park, S. J., Jang, J. Y., Jeong, S. W., Cho, Y. K., Lee, S. H., Kim, S. G., ... Bang, H. I. (2017). Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine*, 96(11). <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000005811>
- Park, S., Wiwi, C. A., & Waxman, D. J. (2006). Signalling cross-talk between hepatocyte nuclear factor 4 α and growth-hormone-activated STAT5b. *Biochemical Journal*, 397(1), 159–168. <http://doi.org/10.1042/BJ20060332>
- Park, Y., Spiegelman, D., Hunter, D. J., Albanes, D., Bergkvist, L., Buring, J. E., ... Smith-Warner, S. A. (2010). Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: A pooled analysis of prospective cohort studies. *Cancer Causes and Control*, 21(11), 1745–1757. <http://doi.org/10.1007/s10552-010-9549-y>
- Polakis, P. (1999). The oncogenic activation of β -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9, 15–21.
- Preissner, S. C., Hoffmann, M. F., Preissner, R., Dunkel, M., & Gewiss, A. (2013). Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy. *PLoS ONE*, 8(12), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082562>
- QIAGEN. (2009). QIAzol® Handbook, 1–24.
- Qu, K. Z., Zhang, K., Li, H., Afdhal, N. H., & Albitar, M. (2011). Circulating MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(4),

- 355–360. <http://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181f18ac2>
- Rowlands, M. G., Barrie, S. E., Chan, F., Houghton, J., Jarman, M., McCague, R., & Potter, G. A. (1995). Esters of 3-Pyridylacetic Acid That Combine Potent Inhibition of 17 α -Hydroxylase/C17,20-Lyase (Cytochrome P45017 α) with Resistance to Esterase Hydrolysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(21), 4191–4197. <http://doi.org/10.1021/jm00021a008>
- Ryan, C. J., Smith, M. R., Fong, L., Rosenberg, J. E., Kantoff, P., Raynaud, F., ... Small, E. J. (2010). Phase I clinical trial of the CYP17 inhibitor abiraterone acetate demonstrating clinical activity in patients with castration-resistant prostate cancer who received prior ketoconazole therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), 1481–1488. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.1281>
- Saini, S., Hirata, H., Majid, S., & Dahiya, R. (2009). Functional significance of cytochrome P450 1B1 in endometrial carcinogenesis. *Cancer Research*, 69(17), 7038–7045. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1691>
- Sakai, H., Shimizu, M., & Moriwaki, H. (2014). A Role for Acyclic Retinoid in the Chemoprevention of Hepatocellular Carcinoma: Therapeutic Strategy Targeting Phosphorylated Retinoid X Receptor- α . *Diseases*, 2(3), 226–242. <http://doi.org/10.3390/diseases2030226>
- Sato, Y., Nakata, K., Kato, Y., Shima, M., Ishii, N., Koji, T., ... Nagataki, S. (1993). Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *The New England Journal of Medicine*, 328(25), 1802–1806. [http://doi.org/10.1016/S0002-9149\(99\)00324-0](http://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00324-0)
- Sauzay, C., Petit, A., Bourgeois, A. M., Barbare, J. C., Chauffert, B., Galmiche, A., & Houessinon, A. (2016). Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 463, 39–44. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2016.10.006>
- Schiødt, F. V., Ostapowicz, G., Murray, N., Satyanarana, R., Zaman, A., Munoz, S., & Lee, W. M. (2006). Alpha-fetoprotein and prognosis in acute liver failure. *Liver Transplantation*, 12, 1776–1781. <http://doi.org/10.1002/lt>
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., ... Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*, 47(5), 505–511. <http://doi.org/10.1038/ng.3252>
- Shatalova, E. G., Klein-szanto, A. J. P., Devarajan, K., & Clapper, M. L. (2011). Estrogen and Cytochrome P450 1B1 Contribute to Both Early- and Late-Stage Head and Neck Carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, 4(1), 107–115. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0133.Estrogen>
- Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Science*, 95(1), 1–6.
- Silvestri, L., Sonzogni, L., De Silvestri, A., Gritti, C., Foti, L., Zavaglia, C., ... Silini, E. M. (2003). Cyp Enzyme Polymorphisms And Susceptibility To Hcv-Related Chronic Liver Disease And Liver Cancer. *International Journal of Cancer*, 104, 310–317. <http://doi.org/10.1002/ijc.10937>
- Simon, R. (2015). Sensitivity, Specificity, PPV, and NPV for Predictive Biomarkers. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(8), 24–26. <http://doi.org/10.1093/jnci/djv153>
- Simonetti, R. G., Cammà, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G., & Pagliaro, L. (1991). Hepatocellular carcinoma - A worldwide problem and the major risk factors. *Digestive*

- Diseases and Sciences*, 36(7), 962–972. <http://doi.org/10.1007/BF01297149>
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182.
- Sterling, R. K., Jeffers, L., Gordon, F., Venook, A. P., Reddy, K. R., Satomura, S., ... Sherman, M. (2009). Utility of Lens culinaris Agglutinin-Reactive Fraction of α -Fetoprotein and Des-Gamma-Carboxy Prothrombin, Alone or in Combination, as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(1), 104–113. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.08.041>
- Stone, D., & Hechter, O. (1955). Studies on ACTH Action in Perfused Bovine Adrenals: Aspects of Progesterone as an Intermediary in Corticosteroidogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 54, 121–128.
- Sung, Y. K., Hwang, S. Y., Park, M. K., Farooq, M., Han, I. S., Bae, H. I., ... Kim, M. (2003). Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2003;94:259–62. *Cancer Science*, 94(3), 259–262.
- Taketa, K. (1990). α -Fetoprotein: Reevaluation. *Hepatology*, 12(6), 1420–1432.
- Taketa, K., Sekiya, C., Namiki, M., Akamatsu, K., Ohta, Y., Endo, Y., & Kosaka, K. (1990). Lectin-Reactive Profiles of Alpha-Fetoprotein Characterizing Hepatocellular Carcinoma and Related Conditions. *Gastroenterology*, 99(2), 508–518.
- Takeyama, K., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J., & Kato, S. (1997). 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -Hydroxylase and Vitamin D Synthesis. *Science*, 277(5333), 1827–1830.
- Tangkijvanich, P., Chanmee, T., Komtong, S., & Mahachai, V. (2010). Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, 129–137. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05988.x>
- Thatcher, J. E., & Isoherranen, N. (2009). The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(8), 875–886. <http://doi.org/10.1517/17425250903032681>.The
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2017). Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell*, 169(7), 1327–1341. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.046>
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge. *Wspolczesna Onkologia*, 19(1A), A68–A77. <http://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>
- Tomimaru, Y., Eguchi, H., Nagano, H., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., ... Mori, M. (2012). Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(1), 167–175. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.04.026>
- Tomita, S., Okuyama, E., Ohnishi, T., & Ichikawa, Y. (1996). Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1290(3), 273–281. [http://doi.org/10.1016/0304-4165\(96\)00030-X](http://doi.org/10.1016/0304-4165(96)00030-X)
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 65(2), 87–108. <http://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Trevisani, F., D'Intino, P. E., Morselli-Labate, A. M., Mazzella, G., Accogli, E., Caraceni, P.,

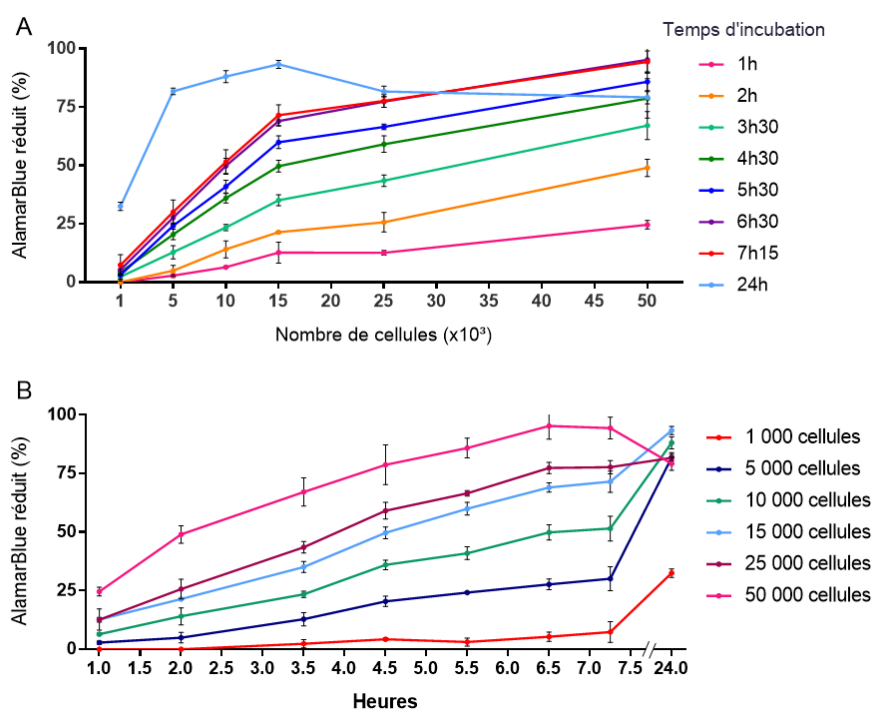
- ... Bernardi, M. (2001). Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: Influence of HBsAg and anti-HCV status. *Journal of Hepatology*, 34(4), 570–575. [http://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00053-2](http://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00053-2)
- Valentine, S. J., Plasencia, M. D., Liu, X., Krishnan, M., Naylor, S., Udseth, H. R., ... Clemmer, D. E. (2006). Toward plasma proteome profiling with ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 5(11), 2977–2984. <http://doi.org/10.1021/pr060232i>
- Varilly, P., & Chandler, D. (2012). 20-HETE-producing Enzymes Are Up-regulated in Human Cancers. *Cancer Genomics Proteomics*, 9(4), 163–169. <http://doi.org/10.1007/s10955-011-0269-9>. Quantifying
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, 318, 1931–1934.
- Volk, M. L., Hernandez, J. C., Su, G. L., Lok, A. S., & Marrero, J. A. (2007). Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: A comparison of AFP, DCP, and AFP-L3. *Cancer*, 101, 79–87.
- Waldman, T. A., & McIntire, K. R. (1972). Serum-alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia-telangiectasia. *The Lancet*, 300(7787), 1112–1115.
- Wang, D., & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10, 181–193. <http://doi.org/10.1038/nrc2809>
- Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., & Chu, T. M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, 17(2), 159–163.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484>. RNA-Seq
- Wauthier, V., & Waxman, D. J. (2008). Sex-Specific Early Growth Hormone Response Genes in Rat Liver. *Molecular Endocrinology*, 22(8), 1962–1974. <http://doi.org/10.1210/me.2007-0549>
- William, R. T. (1971). The metabolism of certain drugs and food chemicals in man. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 179(1), 141–154.
- World health organization. (2018). Fact sheet: Cancer. [En ligne] URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Consulté le 12 décembre 2018].
- Xu, C., Li, C. Y.-T., & Kong, A.-N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 28(3), 249–68.
- Xu, H., Wei, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Li, F., Liu, J., ... Shen, P. (2012). Oestrogen attenuates tumour progression in hepatocellular carcinoma. *Journal of Pathology*, 228(2), 216–229. <http://doi.org/10.1002/path.4009>
- Xu, J., Wu, C., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., ... Lin, D. (2011). Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in Patients With Hepatocellular Carcinoma or Chronic Hepatitis. *Molecular Carcinogenesis*, 50, 136–142. <http://doi.org/10.1002/mc.20712>
- Yang, H., Zhang, X., Cai, X., Wen, D., Ye, Z., Liang, L., ... Feng, Z. (2017). From big data to diagnosis and prognosis: gene expression signatures in liver hepatocellular carcinoma. *PeerJ*, 5(e3089). <http://doi.org/10.7717/peerj.3089>
- Yates, B., Braschi, B., Gray, K., Seal, R., Tweedie, S., & Bruford, E. (2017). Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D619–625.
- Yokota, S., Higashi, E., Fukami, T., Yokoi, T., & Nakajima, M. (2011). Human CYP2A6 is regulated by nuclear factor-erythroid 2 related factor 2. *Biochemical Pharmacology*, 81(2), 289–294. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.09.020>

- Yoshino, M. (1983). Growth kinetics of hepatocellular carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 13(1), 45–52.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25–33. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zhang, B., & Yang, B. (1999). Combined α fetoprotein testing and ultrasonography as a screening test for primary liver cancer. *Journal of Medical Screening*, 6(2), 108–110. <http://doi.org/10.1136/jms.6.2.108>
- Zhou, L., Du, Y., Zhang, X., & Chen, Q. (2018). Identification of molecular target genes and key pathways in hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis. *OncoTargets and Therapy*, 11, 1861–1869.
- Zordoky, B. N. M., & El-kadi, A. O. S. (2009). Role of NF- κ B in the Regulation of Cytochrome P450 Enzymes. *Current Drug Metabolism*, 10, 164–178.

ANNEXES

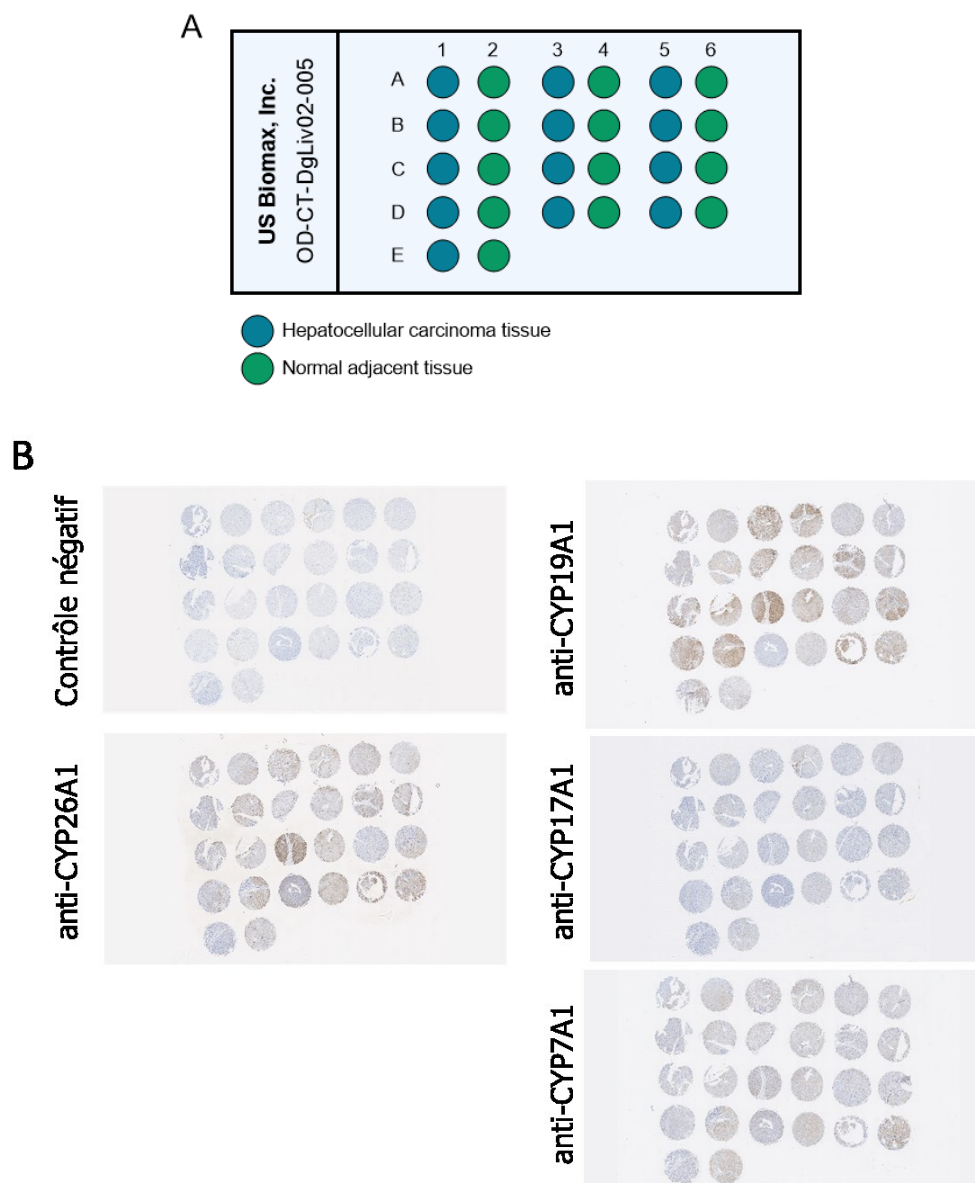
Genes		Forward Sequence	Reverse Sequence
Reference genes	MRPL19	AAGGAGAAAAGTACTCCACATTCCAGAG	TGGGTCAGCTGTAGTAACACGA
	PUM	TGAGGTGTGCACCATGAAC	CAGAATGTGCTTGCCATAGG
	SDHA	TGTTGATGGGAACAAGAGGGCA	GCCTACCACCACTGCATCAAAT
	YWHAZ	TCCCCAATGCTTCACAAGCAGA	TCTTGT CAT CACCAGCGGCAA
Gene of interest	CYP2C19	TGGAACGCATGGTGGTGCTG	CTCCTTCCATCTCTTTCCATTGCTGA
	CYP1A2	CGCTACCTGCCTAACCTGC	CCCGGACACTGTTCTTGTCAAAGTC
	CYP17A1	GGCAAGGACTTCTCTGGGCGG	CCTTGAACAGGGCAAAGGTGGC
	CYP19A1	GTCTGCTCCTCACTGGCCTT	TCCCCATCCACAGGAATCTGCC
	CYP1B1	CAGTGGCTGCTCCTCCTCTCA	GGGCAGGTTGGGCTGGTCAC
	CYP26A1	TCCAGAAAGTGCGAGAAGAGCTG	TGGAAGTGGGGGATTCAAGTCA
	CYP2B6	CACTGCTCTCCATGACCCACAC	GCCTTCAACCAAGACAAATCCGC
	CYP7A1	TGCTGGTCAAAAAGTCAGCTTGGA	GGATGTTGAGGGAGGCACTGGA

Annexe 1. Séquences des amorces. Séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour la quantification par qRT-PCR des cytochromes P450 d'intérêt dans les échantillons d'ADN complémentaire de tissus sains ou d'hépatocarcinomes ou encore dans les lignées cellulaires modèles.



Annexe 2. Optimisation de l'essai de viabilité cellulaire avec l'AlamarBlue®.

Détermination du nombre de cellules où la quantité de réactif réduit est linéaire selon le nombre de cellules métaboliquement actives (A) ainsi que le temps d'incubation nécessaire avec le réactif pour que les cellules le réduisent (B).



Annexe 3. Immunohistochimie de CYP19A1, CYP17A1, CYP7A1 et CYP26A1 sur des tissus d'hépatocarcinomes et des tissus normaux adjacents, résultats complets. (A) Schéma des lames comportant 13 paires de tissus d'hépatocarcinomes et de tissus normaux adjacents (US Biomax inc, OD-CT-DgLiv02-005). (B) Résultats des immunohistochimies réalisées selon le protocole d'Agilent leurs réactifs (*Dako EnVision+ system-HRP (DAB)*, K4011). Anticorps primaires anti-CYP7A1 dilué 1:1000 (Abcam, ab79847), anti-CYP17A1 1:100 (Abcam, ab134910), anti-CYP19A1 1:500 (Abcam, ab124776), anti-CYP26A1 1:250 (Abcam, ab172474) et anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP. Révélation par le chromogène DAB et contre coloration à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine.